



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche
Scientifique
Université Mohamed Chérif Messadia – Souk Ahras
Institut des Sciences Agronomiques et Vétérinaires
Département des Sciences Vétérinaires



Thèse

Présentée pour l'obtention du diplôme de
Doctorat Es-Sciences Vétérinaires
Spécialité : Zootechnie
Option : Gestion et santé en élevage des petits ruminants

Titre

**UTILISATION DU SPERME EPIDIDYMAIRE EN VUE DE
LA MISE EN PLACE D'UNE BANQUE GÉNÉTIQUE**

Présentée par

OUENNES Houria

Devant le jury suivant

1	MAAZI Mohamed Chérif	Pr	U. Souk Ahras	Président
2	BOUZEBDA AFRI Farida	Pr	ISAV. Souk Ahras	Directrice de thèse
3	BOUZEBDA Zoubir	Pr	ISAV. Souk Ahras	Co-encadreur
4	BENAKHLA Ahmed	Pr	U. El-Tarf	Examineur
5	BERERHI El Hacem	Pr	U. Constantine	Examineur
6	AISSI Adel	Pr	U. Batna	Examineur
7	RIGHI Souad	M.C.A	U. El-Tarf	Examinatrice
8	MERGHAD Amina	M.C.A	U. Souk Ahras	Examinatrice
9	AMARI Hamid	Pr	PMA. Annaba	Invité

Remerciements

En tout premier lieu, je remercie Dieu Le tout puissant de m'avoir donné la force, le courage et la bonne santé pour survivre, pour dépasser toutes les difficultés.

Ce travail de thèse a été le labeur de plusieurs années et n'aurait probablement jamais été mené à terme sans le soutien d'un grand nombre de personnes que je tiens vivement et très sincèrement à remercier.

Mes remerciements vont :

Au Professeure BOUZEBDA AFRJ F.

Ma directrice de thèse qui m'a proposé ce sujet et m'a défini les différentes orientations. Elle m'a facilité l'accès dans des laboratoires de pointe en la matière pour effectuer des stages qui m'ont permis de parfaire ma formation. Mes remerciements pour l'aide qu'elle m'a apportée au cours de cette recherche, pour son intérêt et ses précieux conseils qui m'ont été d'un grand profit, pour sa supervision, son appui, sa compréhension, ses excellentes directives, je suis très reconnaissante d'avoir reçu une formation post universitaire, de première qualité.

Sincères remerciements.

Au Professeur BOUZEBDA Z.

Professeur, à l'université de Souk Ahras,

Tout le respect et la gratitude à notre cher et honorable professeur, pour avoir accepté d'être co-promoteur de ce travail. Et qui a été l'enseignant, le père et le conseil. Puissiez trouver ici le témoignage de notre gratitude.

Hommages respectueux

À Professeur MAAZI M-C.

Professeur, à l'université de Souk Ahras,

Qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de notre jury de thèse, c'est pour nous un grand honneur ; veuillez croire en notre gratitude.

Hommages respectueux

Aux Professeurs BENAKHL A, BERERHI E-H et AISSI A. ; je suis très sensible à l'honneur que vous me faites en acceptant d'examiner ce travail et de l'enrichir avec vos remarques.

Veuillez accepter notre profonde gratitude

Hommages respectueux

Ces mêmes remerciements s'adressent aux Docteurs **RIGHI S.** et **MERGHUAD A.** pour avoir accepté de faire partie de ce jury de thèse et de juger ce travail, et se sont rendues disponibles pour ma soutenance.

Sincères remerciements.

Toute ma profonde reconnaissance et mes sincères remerciements vont à nos invités monsieur le **Pr AMARI H.** chef de service PMA, clinique El Farabi, propriétaire du laboratoire de cytogénétique Annaba, et le **Pr AISSAOUI M.** directeur de la clinique El Farabi Annaba, pour m'avoir accueillie et ouvert les portes de leur Laboratoire.

Hommages respectueux

À toute l'équipe du CrBt,

J'adresse mes vifs remerciements à toute l'équipe du CrBt « Centre national de Recherche en Biotechnologie » Constantine, et en particulier : Au chef du laboratoire de biotechnologie animale, Docteur **SMADI M-A.** et Docteur **MAJDOUB S.** qui m'ont aidé avec la plus grande efficacité, dans mes recherches. Ils m'ont fourni tous les moyens disponibles pour mener à bien mes expérimentations avec toute la liberté voulue.

Mes sincères et profondes reconnaissances.

J'adresse aussi mes vifs remerciements au **Dr TABCHOUCHE,** propriétaire du laboratoire d'analyse El Tarf où j'ai effectué quelques traitements, pour l'accueil, les conseils et surtout pour la mise à ma disposition de tout le matériel nécessaire pour la réalisation de ce travail, bien qu'aucun partenariat n'existe, entre le laboratoire et l'université.

Hommages respectueux

À mes chères amis ; **Samia, Asma, Amel, Luisa, Sabrina, Djalel, Mehdi, Khair-Eddine et Atef.** Merci d'avoir embelli mon quotidien et de m'avoir donné l'espoir pour aller de l'avant.

Sincères remerciements

Je souhaite particulièrement remercier Monsieur **AISSI A-Y.** président de la firme *Agroconseil* Montréal, Canada, d'avoir accepté ma demande de stage au sein de sa firme.

Sincères remerciements

Enfin, pour clore ces remerciements, mes pensées vont à mon amie et sœur **Sahi S.** celle qui partage ma vie depuis de nombreuses années déjà, avec qui je passe tant de moments magiques et qui a eu l'extrême courage de me supporter durant la rédaction de cette thèse. Merci de m'avoir toujours soutenu et d'y avoir cru... souvent plus que moi. Je te remercie du fond du cœur pour tout ce que tu m'as apporté, pour tout ce que nous avons vécu, mais aussi et tout simplement pour ce que tu es.

OUENNES HOURJA

Dédicaces

*À mes parents, du plus profond de mon cœur ;
À mes sœurs, et mes frères de tout mon cœur ;
À mes neveux, et mes nièces ;
À mes amis.*



Résumé

L'objectif de notre projet est de contribuer au domaine de la cryoconservation du sperme épидидymaire et de définir les particularités d'espèces pour faciliter l'aboutissement de la cryoconservation et la mise en place d'une banque cryogénique des populations animales locales menacées de disparition par l'infusion croissante de races exotiques plus performantes ou celles menacées par les facteurs environnementaux. Trois volets ont été abordés avant de contribuer à la création d'une banque nationale de sperme épидидymaire :

La première expérimentation était d'examiner pour la première fois les caractéristiques et la conservation des spermatozoïdes post-mortem, obtenus à partir de l'épididyme et du canal déférent de coqs adultes de population locale. Comparer la qualité du sperme au niveau de l'épididyme et du canal déférent. Déterminer l'efficacité de deux techniques de prélèvement de sperme post-mortem et l'effet de la conservation in situ à différentes températures (2h et 24h à 20°C et après réfrigération à 4°C pendant 24h).

La deuxième expérience a permis d'évaluer la qualité en pré congélation et en post congélation du sperme épидидymaire du bouc local en fonction de la température de stockage des testicules et du temps écoulé entre la mort de l'animal et la récupération du sperme (0, 24, 48, 72 h), pour établir les protocoles optimaux de la cryoconservation du sperme épидидymaire dans cette espèce.

Un troisième volet, une comparaison de l'effet de l'inclusion de 5 $\mu\text{g/ml}$ de trois antioxydants dans le dilueur de congélation de sperme épидидymaire de taureau locale : La quercétine, le trolox et l'acide tannique. Selon les résultats obtenus, on peut conclure que des échantillons de sperme de bonne qualité peuvent être collectés à partir du canal déférent avec la méthode de rinçage, et que le sperme chez le coq local peut être conservé in situ à 20°C pendant 24h sans altération de la qualité spermatique. Chez le bouc local, la température ambiante (21.5°C) et de réfrigération (4°C) des spermatozoïdes, permettent de maintenir jusqu'à 48 heures après la mort, une très bonne qualité de sperme épидидymaire de bouc avant sa congélation.

La cryoconservation du sperme épидидymaire de bouc, conservé in situ pendant 48h à 4°C n'a pas influencé d'une façon significative les paramètres spermatiques : la motilité, la mobilité progressive, la viabilité, l'intégrité acrosomique, l'intégrité de la membrane et le taux d'anomalies. L'ajout des antioxydants aux dilueurs a démontré qu'il existe une grande différence significative ($p < 0.001$) entre le témoin et les autres antioxydants alors qu'il n'y a pas de différences entre les trois antioxydants. Avec des valeurs meilleures dans les deux milieux de dilution avec le trolox et la quercétine pour l'ensemble des valeurs chez l'espèce bovine.

Finalement un total de 1879 doses de sperme, a été cryoconservé auprès d'un total de 41 donneurs de races locales (bovins, caprins, ovins, coqs) comme première démarche pour la mise en place d'une banque génétique de sperme épидидymaire. Les difficultés rencontrées et les recommandations pour faire aboutir notre projet de mettre sur pied une cryobanque pour les populations animales locales sont présentées.

Mots clés. Algérie, banque génétique, conservation, cryoconservation, population locale, sperme épидидymaire.

Abstract

The objective of our project is to contribute to the field of cryopreservation of epididymal sperm and to define the particularities of species in order to facilitate the successful completion of cryopreservation and the establishment of a cryogenic bank of local animal populations threatened with extinction, by the growing infusion of more efficient exotic breeds or those threatened by environmental factors. Three aspects were addressed before contributing to the creation of a national epididymal sperm bank:

The first experiment was to examine for the first time the characteristics and preservation of post-mortem spermatozoa, obtained from the epididymis and vas deferens of adult roosters from the local population. Compare the quality of sperm at the level of the epididymis and the vas deferens. To determine the effectiveness of two post-mortem sperm collection techniques and the effect of in situ storage at different temperatures (2h and 24h at 20 ° C and after refrigeration at 4 ° C for 24h).

The second experiment made it possible to evaluate the quality in pre-freezing and post-freezing of the epididymal sperm of the local goat, as a function of the storage temperature of the testes, and the time elapsed between the death of the animal and the recovery of the sperm (0, 24, 48.72 h), to establish the optimal protocols for cryopreservation of epididymal sperm in this species.

In a third part, a comparison of the effect of 5 µg / ml of three antioxidants in the local bull epididymal sperm freezing diluent: Quercetin, trolox and tannic acid.

According to the results obtained, it can be concluded that good quality semen samples can be collected from the vas deferens with the flushing method, and that the local rooster sperm can be stored in situ at 20°C for 24 hours without change of sperm quality. Room temperature (21.5°C) and refrigeration (4°C) allow maintaining up to 48 hours after death, a very good quality of goat epididymal semen before freezing. Cryopreservation of the goat's epididymal sperm stored in situ for 48 hours at 4 ° C did not significantly influence the sperm parameters: motility, progressive mobility, viability, acrosomal integrity, integrity of the sperm. Membrane and the rate of abnormalities. The addition of the antioxidants to the diluents demonstrated that there is a large significant difference ($p < 0.001$) between the control and the other antioxidants while there is no difference between the three antioxidants. With better values in the two-dilution media with trolox and quercetin for all values in the bovine species.

Finally, 1879 doses of sperm were stored with 41 donors of local breeds (cattle, goats, sheep, and roosters) as a first step in the establishment of an epididymal sperm genetic bank. The difficulties encountered and the recommendations for the success of our project to set up a cryobank for local animal populations are presented.

Keywords: Algeria, genetic bank, conservation, cryopreservation, local population, epididymal sperm.

المخلص

الهدف من مشروعنا هو المساهمة في مجال الحفظ بالتبريد للحيوانات المنوية البربخية وتحديد خصائص الأنواع لتسهيل إكمال الحفظ بالتبريد بنجاح وإنشاء بنك مبرد لأعداد من الحيوانات المحلية المهتدة بالانقراض، السلالات الغربية الأكثر كفاءة أو تلك المهتدة بالعوامل البيئية. تمت مناقشة ثلاثة جوانب قبل المساهمة في إنشاء بنك وطني للحيوانات المنوية البربخية:

كانت التجربة الأولى هي فحص خصائص الحيوانات المنوية بعد الوفاة التي تم الحصول عليها من البربخ والأسهر من الديوك البالغة من السكان المحليين والحفاظ عليها لأول مرة. قارنا بين جودة الحيوانات المنوية على مستوى البربخ والأسهر. لتحديد فعالية جمع الحيوانات المنوية بعد الذبح وتأثير التخزين في الموقع في درجات حرارة مختلفة (ساعتان و24 ساعة عند 20 درجة مئوية وبعد التبريد عند 4 درجات مئوية لمدة 24 ساعة).

أتاحت التجربة الثانية تقييم جودة الحيوانات المنوية البربخية للماعز المحلي في مرحلة ما قبل التجميد وما بعد التجميد بدلالة درجة حرارة تخزين الخصيتين والوقت المنقضي بين موت الحيوان وانتعاشه. (0، 24، 48.72 ساعة)، وإنشاء البروتوكولات المثلى للحفاظ بالتبريد على الحيوانات المنوية البربخية في هذا النوع.

في الجزء الثالث، مقارنة تأثير تضمين 5 ميكروغرام / مل من ثلاثة مضادات أكسدة في مخفف تجميد الحيوانات المنوية البربخ المحلي: كيرسيتين، ترولوكس وحمض التانيك.

وفقاً للنتائج التي تم الحصول عليها، يمكن استنتاج أنه يمكن جمع عينات من السائل المنوي ذات نوعية جيدة من الأسهر باستخدام طريقة التنظيف، وأنه يمكن تخزين الحيوانات المنوية المحلية في مكانها عند درجة حرارة 20 درجة مئوية لمدة 24 ساعة دون تغيير في جودته. تسمح درجة حرارة الغرفة (21.5 درجة مئوية) والتبريد (4 درجات مئوية) بالحفاظ لمدة تصل إلى 48 ساعة بعد الموت، وهي نوعية جيدة جداً من السائل المنوي للماعز قبل التجميد. لم يؤثر الحفظ بالتبريد للحيوانات المنوية البربخية للماعز المخزنة في الموقع لمدة 48 ساعة عند 4 درجات مئوية بشكل كبير على معاملات الحيوانات المنوية: الحركة، والتنقل التدريجي، والحيوية، وسلامة الحيوانات المنوية، ومعدل التشوهات. أظهرت إضافة مضادات الأكسدة إلى المخففات أن هناك فرقاً كبيراً معنوياً ($p < 0.001$) بين مجموعة التحكم ومضادات الأكسدة الأخرى بينما لا يوجد فرق بين مضادات الأكسدة الثلاثة. مع قيم أفضل في وسطي التخفيف مع ترولوكس وكيرسيتين لجميع القيم في أنواع الأبقار.

أخيراً، تم تخزين مجموعه 1879 جرعة من الحيوانات المنوية مع مجموعه 41 متبرعاً من السلالات المحلية كخطوة أولى في إنشاء بنك جيني للحيوانات المنوية البربخية. يتم عرض الصعوبات التي تمت مواجهتها والتوصيات الخاصة بنجاح مشروعنا لإنشاء بنك تجميد للحيوانات المحلية.

الكلمات المفتاحية

الجزائر، البنك الوراثي، الحفظ، الحفظ بالتبريد، القطعان المحلية، الحيوانات المنوية البربخية

Table des matières

Table des figures.....	I
Liste des tableaux	III
Liste des abréviations	VI
Introduction Générale	1

Premier volet: Caractérisation du sperme post-mortem chez le coq fermier dans l'Est de l'Algérie

Introduction.....	19
I. Matériels et Méthodes.....	23
I.1 Site expérimental	23
I.2 Matériels.....	23
I.2.1 Matériels biologiques	23
I.2.2 Matériels non biologiques.....	24
I.2.2.1 Matériels d'euthanasie des coqs	24
I.2.2.2 Matériels de prélèvement et d'étude du sperme	24
I.2.2.3 Matériels de conservation	26
I.3 Méthodes	26
I.3.1 Méthode d'extraction du canal déférent et de l'épididyme chez le coq.....	26
I.3.1.1 L'euthanasie de l'animal.....	26
I.3.1.2 Ouverture de la cavité thoraco-abdominale	26
I.3.1.3 Éviscération.....	26
I.3.2 Méthodes de récolte du sperme.....	27
I.3.2.1 Méthode de Hachage (Mincing).....	28
I.3.2.2 Méthode de flusching ou rinçage.....	28
I.3.2.3 Méthode Flot-up	28
I.3.3 Méthodes d'appréciation de la qualité spermatique	28
I.3.3.1 Détermination du volume spermatique.....	28
I.3.3.2 Détermination de la concentration.....	29
I.3.3.3 Évaluation de la mobilité des spermatozoïdes	29
I.3.3.4 Mesure du pourcentage des spermatozoïdes vivants/morts (nécrospermie)	30
I.3.3.4.1 Coloration de la semence et préparation des lames	30
I.3.3.4.2 Méthode de comptage des différentes classes de spermatozoïdes	31
I.3.3.5 Mesure du pourcentage de spermatozoïdes anormaux (téatospermie).....	31
I.3.3.6 Évaluation de l'intégrité acrosomiale	33
I.3.3.7 Évaluation de la condensation de la chromatine	33
I.3.4 Méthode de conservation.....	33
I.3.5 La cryoconservation du sperme chez le coq	34
I.3.5.1 La Dilution	34
I.3.5.2 Le taux de dilution	34
I.3.6 Études statistiques	34
II. Résultats	35
II.1 Étude de la qualité du sperme post-mortem prélevé au niveau de l'épididyme et du canal déférent	35
II.1.1 Le volume spermatique	35

II.1.2	La concentration de sperme en spermatozoïdes.....	36
II.1.3	La motilité massale.....	36
II.1.4	Le pourcentage des spermatozoïdes vivants.....	36
II.1.5	Le pourcentage des spermatozoïdes anormaux.....	36
II.1.6	La condensation de la chromatine.....	36
II.2	Étude comparative entre deux méthodes de récolte du sperme post-mortem chez le coq adulte	
	37
II.2.1	Volume spermatique.....	38
II.2.2	Concentration de sperme.....	38
II.2.3	Motilité massale.....	38
II.2.4	Pourcentage de spermatozoïdes vivants.....	38
II.2.5	Pourcentage de spermatozoïdes anormaux (tératospermie).....	38
II.3	Effet de la température sur la qualité du sperme post-mortem.....	39
II.3.1	Motilité massale.....	39
II.3.2	Pourcentage de spermatozoïdes vivants.....	39
II.3.3	Le pourcentage des spermatozoïdes anormaux et l'intégrité acrosomiale.....	40
III.	Discussion.....	41
III.1	Étude de la qualité du sperme post-mortem prélevé au niveau de l'épididyme et du canal déférent.....	41
III.1.1	Volume spermatique.....	42
III.1.2	Concentration spermatique.....	42
III.1.3	Motilité massale.....	43
III.1.4	Pourcentage moyen de spermatozoïdes vivants.....	45
III.1.5	Pourcentage de spermatozoïdes anormaux (tératospermie).....	45
III.1.6	Condensation de la chromatine.....	46
III.2	Étude comparative entre deux méthodes de récolte du sperme post-mortem chez le coq adulte	
	46
III.2.1	Volume spermatique.....	47
III.2.2	Concentration spermatique.....	47
III.2.3	Motilité massale.....	48
III.2.4	Pourcentage de spermatozoïdes vivants.....	48
III.2.5	Pourcentage des spermatozoïdes anormaux ou tératospermie.....	48
III.3	Les effets de conservation du canal déférent à différentes températures sur la qualité spermatique.....	49
III.3.1	Motilité massale.....	49
III.3.2	Pourcentage de spermatozoïdes vivants.....	50
III.3.3	Pourcentage de spermatozoïdes anormaux et l'intégrité acrosomiale.....	50
	Conclusion.....	52

Deuxième volet : Effet de la température de conservation des testicules de bouc, sur la qualité du sperme épидидymaire : Première étape vers la cryobanque de races locales algériennes

Introduction.....	54
I. Matériels et Méthodes.....	54
I.1 Matériels.....	54
I.1.1 Site expérimental.....	54
I.1.2 Matériels biologiques	54
I.1.3 Matériels non biologiques.....	55
I.1.3.1 Matériels de prélèvement du sperme	55
I.1.3.2 Matériels d'appréciation de la qualité spermatique et de congélation.....	55
I.1.3.3 Produits chimiques.....	57
I.2 Méthodes	58
I.2.1 Identification de l'âge des boucs.....	58
I.2.2 Méthode de récolte du sperme épидидymaire chez le bouc.....	58
I.2.3 Méthode d'appréciation de la qualité et de la quantité spermatique	59
I.2.3.1 Le volume spermatique	59
I.2.3.2 Le nombre de doses	59
I.2.3.3 Évaluation de la mobilité des spermatozoïdes	60
I.2.3.4 Évaluation de l'intégrité acrosomiale	61
I.2.3.5 Le test hypo-osmotique (testHost).....	62
I.2.3.6 La viabilité et le pourcentage de spermatozoïdes anormaux	63
I.2.4 La congélation du sperme épидидymaire chez le bouc	63
I.2.4.1 La dilution	63
I.2.4.1.1 Composition du milieu de dilution.....	64
I.2.4.1.2 Le taux de dilution ou la concentration finale en spermatozoïdes.....	64
I.2.4.2 L'équilibration.....	64
I.2.4.3 Le conditionnement	65
I.2.4.4 La congélation	65
I.2.5 La décongélation du sperme épидидymaire	65
I.2.6 Étude statistique de l'effet du temps et de la température sur la qualité du sperme épидидymaire chez le bouc.....	66
II. Résultats	67
II.1 La production de spermatozoïdes	67
II.2 Résultat de l'effet de la température et le temps de conservation des gonades chez le bouc avant la congélation.....	67
II.2.1 Analyse descriptive de l'effet de la température ambiante (21.5 °C) de stockage des testicules.....	67
II.2.2 Analyse de variance des parametres spermatiques des gonades conservées à 21.5 °C et à différents temps	68
II.2.2.1 L'analyse de la variance de l'effet du PMT, du TEMP sur la motilité, mobilité progressive et les paramètres cinétiques des spermatozoïdes avant congélation	68
II.2.3 Analyse de l'effet du stockage des testicules à 4 °C avant congélation.....	70
II.2.4 Analyse de variance des parametres spermatiques des gonades conservées à 4 °C et à différents temps.....	70

II.2.4.1	L'analyse de la variance de l'effet du PMT, du TEMP sur la motilité, mobilité progressive et les paramètres cinétiques des spermatozoïdes avant congélation	70
II.2.4.2	L'analyse de la variance de l'effet du PMT, du TEMP sur la viabilité, le test Host, l'intégrité acrosomiale et le pourcentage des spermatozoïdes anormaux avant congélation	71
II.2.5	Analyse de la variance des paramètres spermatique selon le temps (PMT) et la température de conservation des gonades avant congélation.....	72
II.3	Résultats de l'effet du temps et de la température post mortem sur les paramètres spermatiques après congélation.....	74
II.3.1	Analyse descriptive de l'effet de stockage des testicules à 21.5 °C sur les paramètres spermatiques après congélation	74
II.3.2	Analyse de la variance de l'effet de PMT et TEMP sur la qualité spermatique après congélation	74
II.3.2.1	L'analyse de la variance de l'effet du PMT, du TEMP sur la motilité, mobilité progressive et les paramètres cinétiques des spermatozoïdes après congélation	75
II.3.2.2	L'analyse de la variance de l'effet du PMT, du TEMP sur la viabilité, le test Host, l'intégrité acrosomiale et le pourcentage des spermatozoïdes anormaux après congélation	75
II.3.3	Analyse descriptive de l'effet de stockage des testicules à 4 °C sur la qualité spermatique après congélation	76
III.	Discussion	80
III.1	Production du sperme épидидymaire selon le temps post-mortem.....	80
III.2	Les effets de la température de stockage des testicules (TEMP) et du temps post-mortem (PMT) avant congélation	81
III.2.1	La motilité massale.....	81
III.2.2	La Mobilité progressive.....	82
III.2.3	Les paramètres cinétiques.....	83
III.2.4	La viabilité des spermatozoïdes	84
III.2.5	L'intégrité acrosomiale.....	85
III.2.6	Le test de gonflement hypo-osmotique	86
III.2.7	Anomalies des spermatozoïdes (téatospermie).....	87
III.3	Les effets de la température de stockage des testicules (TEMP) et du temps post-mortem (PMT) en post-congélation sur la qualité du sperme épидидymaire chez le bouc de la population locale.....	88
III.3.1	La Motilité massale	88
III.3.2	La Mobilité progressive.....	89
III.3.3	Les paramètres cinétiques.....	89
III.3.4	La viabilité des spermatozoïdes	90
III.3.5	L'intégrité acrosomiale.....	90
III.3.6	Le test de gonflement hypo-osmotique	91
III.3.7	Anomalies des spermatozoïdes (téatospermie).....	91

Troisième volet: Effets des antioxydants (Acide tannique, Trolox, Quercétine) sur le sperme épидидymaire cryoconservé chez la population bovine locale

Introduction.....	94
I. Matériels et Méthodes.....	98
I.1 Matériels.....	98
I.1.1 Site expérimental.....	98
I.1.2 Matériels biologiques	98
I.1.3 Matériels non biologiques.....	98
I.1.4 Produits chimiques	99
I.2 Méthodes	99
I.2.1 Identification de l'âge et prise du poids des taureaux	99
I.2.2 Méthode de récolte du sperme	99
I.2.3 La dilution.....	99
I.2.3.1 La composition du dilueur	100
I.2.3.2 Le taux de dilution ou la concentration finale en spermatozoïdes	100
I.2.4 Méthode de conservation et de décongélation du sperme épидидymaire chez le Taureau.....	100
I.2.5 Méthode d'appréciation de la qualité spermatique après congélation	101
I.2.5.1 Peroxydation lipidique	101
I.2.5.2 Étude statistique.....	102
II. Résultats	103
II.1 Effets des antioxydants sur la motilité massale et mobilité progressive.....	103
II.2 Effet des antioxydants quercétine, trolox et l'acide tannique sur les paramètres cinétiques ($\bar{X} \pm SEM$).....	103
II.3 Effet de la quercétine, le trolox et l'acide tannique sur la viabilité, LE test HOST, l'intégrité acrosomique et le pourcentage des spermatozoïdes anormaux ($\bar{X} \pm SEM$).	105
II.4 Effet des antioxydants sur la peroxydation lipidique ($\bar{X} \pm SEM$).....	106
II.5 Comparaison entre les quatre milieux de cryoconservation.....	106
III. Discussion	108
III.1 Effet des antioxydants (Q, TA, TR) sur la motilité massale, la mobilité progressive et les paramètres cinétiques	108
III.1.1 Effet de la Quercétine.....	108
III.1.1.1 La Motilité massale	108
III.1.1.2 Mobilité progressive	109
III.1.1.3 Les paramètres cinétiques.....	110
III.1.2 Effet du Trolox.....	110
III.1.2.1 Motilité massale	110
III.1.2.2 La Mobilité progressive	112
III.1.2.3 Les paramètres cinétiques.....	112
III.1.3 Effet de l'Acide Tannique (TA).....	113
III.1.3.1 La motilité massale.....	113
III.1.3.2 La mobilité progressive	113
III.1.3.3 Les paramètres cinétiques.....	113

III.2 Effet des antioxydants (Q, TA, TR) sur la viabilité, le pourcentage des spermatozoïdes vivants, test HOST, intégrité acrosomique et les anomalies des spermatozoïdes.....	114
III.2.1 Effet de la Quercétine.....	114
III.2.1.1 La viabilité.....	114
III.2.1.2 Test HOST (gonflement hypo-osmotique).....	114
III.2.1.3 Intégrité de l'acrosome.....	115
III.2.1.4 Pourcentage de spermatozoïdes anormaux (téatospermie).....	115
III.2.2 Effet de Trolox.....	116
III.2.2.1 La Viabilité.....	116
III.2.2.2 Test HOST (gonflement hypo-osmotique).....	116
III.2.2.3 L'intégrité acrosomiale.....	117
III.2.2.4 Pourcentage des spermatozoïdes anormaux.....	118
III.2.3 Effet de l'acide tannique (TA).....	118
III.2.3.1 La viabilité et le testHOST.....	118
III.2.3.2 L'intégrité de l'acrosome et la téatospermie.....	118
III.3 Effet des antioxydants (Q, TA, TR) sur la peroxydation lipidique.....	119
III.3.1 Effet de la Quercétine (Q).....	119
III.3.2 Effet de Trolox (TR).....	120
III.3.3 Effet de l'acide tannique.....	121

Quatrième volet: E tat des lieux de la cryobanque à base de sperme épидидymaire pour les ressources génétiques animales en Algérie

Discussion générale.....	127
Conclusion générale et Recommandations.....	145

Table des figures

Figure 1. Répartition de la population locale dans le monde	3
Figure 2. Anatomie des testicules et de l'épididyme.....	9
Figure 3. Photos prises à partir d'un épидидyme de taureau.....	10
Figure 4. Distribution des principales protéines sécrétées par l'épididyme de l'homme, sanglier, bélier et du cheval.....	13
Figure 5. L'évolution de la poule à gauche en 1957, au milieu en 1978 et à droite en 2005 ..	19
Figure 6. Statut de risque des races locales de poulets, par région	22
Figure 7. Site d'expérimentations.....	23
Figure 8. Variété de la population locale de l'espèce aviaire	24
Figure 9. Pipette et micropipette	25
Figure 10. Un microscope à platine chauffante.....	25
Figure 11. Spectrophotomètre.....	25
Figure 12. Etuve	25
Figure 13. Détermination du poids chez le coq.....	26
Figure 14. L'ouverture de la carcasse du coq adulte.....	27
Figure 15. Appareil génital mâle d'un coq adulte.....	27
Figure 16. Extraction du sperme de canal déférent après l'abattage du coq par rinçage.	28
Figure 17. Méthode d'appréciation de la motilité Massale.....	29
Figure 18. Mélange de la goutte du sperme avec colorant (éosine nigrosine).....	31
Figure 19. Étalement du frottis de semence.....	31
Figure 20. Frottis de semence.....	31
Figure 21. Séchage les lames sur une plaque chauffante.....	31
Figure 22. Représentation schématique des anomalies morphologiques de spermatozoïdes ..	32
Figure 23. Appréciation des spermatozoïdes vivants et anormaux	36
Figure 24. Coloration des spermatozoïdes avec bleue d'aniline (la condensation de la chromatine).....	37
Figure 25. Structure de la partie épидидymaire chez le coq (<i>Gallus gallus domesticus</i>).....	42
Figure 26. Variété de la population locale caprine en Est Algérien.....	54
Figure 27. Testicule de Bouc.....	54
Figure 28. Analyseur de sperme assisté par ordinateur (CASA)	56
Figure 29. Bain marie	56
Figure 30. Centrifugeuse.....	56

Figure 31. Hotte.....	56
Figure 32. Osmomètre	56
Figure 33 . Balance de précision	57
Figure 34. pH mètre.....	57
Figure 35. Lame Leja®.....	57
Figure 36. Visotube	57
Figure 37. Canistère.....	57
Figure 38. Boîte en polystyrène (3L).....	57
Figure 39. Détermination de l'âge chez le bouc.....	58
Figure 40. Bain sec réglé à 37 °C.....	59
Figure 41. Trajectoires analysées par les analyseurs de sperme assistés par ordinateur (computer assisted semen analyse, CASA).....	60
Figure 42. Représentation schématique des changements morphologiques typiques des spermatozoïdes soumis à un stress hypo-osmotique.....	62
Figure 43. Représentation schématique des anomalies des spermatozoïdes	63
Figure 44. Schéma d'une paillette (CASSOU).....	65
Figure 45. Identification des paillettes avant la congélation.....	65
Figure 46. Décongélation des paillettes.....	66
Figure 47. Résultat du test de gonflement hypo-osmotique(testHOST)	91
Figure 48. Structure moléculaire de la Quercétine	96
Figure 49. Structure moléculaire du Trolox.....	97
Figure 50. Structure chimique de l'acide tannique.....	97
Figure 51. Spectrophotomètre Accu Read bovine.....	98
Figure 52. Appareil de sonication	98
Figure 53. Centrifugation.....	101
Figure 54. Spectrophotomètre.....	102

Table des tableaux

Tableau 1. Nombre de pays avec des programmes de conservation.....	1
Tableau 2. Activité de conservation au niveau mondial.....	4
Tableau 3. État actuel des techniques de cryoconservation par espèce.....	6
Tableau 4. Utilisation du sperme épидидymaire par espèces.....	8
Tableau 5. Détermination de la note de motilité massale de la semence	30
Tableau 6. Composition du diluant	34
Tableau 7. Analyse descriptive de la qualité du sperme récolté au niveau de l'épididyme et le canal déférent de coqs fermiers dans l'Est Algérie ($\bar{X} \pm SEM$).	35
Tableau 8. Comparaison de la qualité du sperme récolté au niveau de l'épididyme et du canal déférent de coqs fermiers dans l'Est Algérie ($\bar{X} \pm SEM$).	35
Tableau 9. Analyse de comparaison entre deux méthodes de récolte du sperme flot-up (flottaison) et rétrograde (rinçage) chez le coq fermier.	37
Tableau 10. Comparaison de la qualité spermatique post-mortem, selon la technique de récolte chez le coq fermier ($\bar{X} \pm SEM$).	38
Tableau 11. Analyse de la conservation du canal déférent à différents températures et temps (2h et 24h à 20 °C, et 24h à 4 °C) chez le coq fermier.	39
Tableau 12. Effets de la conservation du canal déférent à différentes températures de coqs autochtones dans l'Est Algérie ($\bar{X} \pm SEM$).	39
Tableau 13. Détermination de l'âge.	58
Tableau 14. Définitions des trajectoires et des paramètres étudiés par le CASA.....	61
Tableau 15. Composition du diluant	64
Tableau 16. Analyse descriptive de la production de spermatozoïde.	67
Tableau 17. Analyse de la variance de la production de sperme épидидymaire en fonction du temps post-mortem.	67
Tableau 18. Analyse descriptive de la qualité spermatique de gonades conservées à 21.5 °C avant congélation.	68
Tableau 19. L'analyse de la variance de l'effet du PMT, du TEMP sur la motilité, mobilité progressive et les paramètres cinétiques des spermatozoïdes avant congélation.....	69
Tableau 20. Analyse de la variance de l'effet du PMT, du TEMP sur la viabilité, le test Host, l'intégrité acrosomiale et le % des spermatozoïdes anormaux avant congélation	69
Tableau 21. Analyse descriptive de la qualité spermatique de gonades conservées à 4 °C. ...	70

Tableau 22. Analyse de la variance de l'effet du PMT, du TEMP sur la motilité, mobilité progressive et les paramètres cinétiques des spermatozoïdes épидидymaires avant congélation	71
Tableau 23. Analyse de la variance de l'effet du PMT, du TEMP sur la viabilité, le test Host, l'intégrité acrosomiale et le pourcentage des spermatozoïdes anormaux avant congélation	71
Tableau 24. Analyse de variance des paramètres spermatique selon PMT et TEMP avant congélation.	72
Tableau 25. Analyse descriptive de la qualité spermatique des gonades conservées à 21.5 °C après congélation.	74
Tableau 26. L'analyse de la variance de l'effet du PMT, du TEMP sur la motilité, mobilité progressive et les paramètres cinétiques des spermatozoïdes après congélation	75
Tableau 27. L'analyse de la variance de l'effet du PMT, du TEMP sur la viabilité, le test Host, l'intégrité acrosomiale et le % des spermatozoïdes anormaux après congélation ..	75
Tableau 28. Analyse descriptive de la qualité spermatique après congélation.....	76
Tableau 29. L'analyse de la variance de l'effet du PMT, du TEMP sur la motilité, mobilité progressive et les paramètres cinétiques des spermatozoïdes après congélation	77
Tableau 30. L'analyse de la variance de l'effet du PMT, du TEMP sur la viabilité, le test Host, l'intégrité acrosomiale et le % des spermatozoïdes anormaux après congélation ..	77
Tableau 31. Analyse de variance des paramètres spermatique selon PMT et TEMP après congélation.	78
Tableau 32. Composition de la fraction.....	100
Tableau 33. Analyse de la variance de la motilité massale et mobilité progressive	103
Tableau 34. Analyse de la variance des paramètres cinétique	104
Tableau 35. Analyse de la variance de la viabilité, testHOST, l'intégrité acrosomique et le % des spermatozoïdes anormaux ($\bar{X} \pm \text{SEM}$).....	105
Tableau 36. Analyse de la variance de la peroxydation lipidique (MDA) dans les quatre milieux de cryoconservation ($\bar{X} \pm \text{SEM}$).	106
Tableau 37. Analyse de la variance entre les quatre milieux.....	107
Tableau 38. Risque de transmission de facteurs infectieux par le sperme chez les bovins et les petits ruminants	135

Liste des abréviations

%	Pourcent	T0	Témoin,
<	Inférieur	Ta	Acide Tannique
±	Plus ou moins	TEMP	Température de stockage des testicules
<	Inférieur	Q	Quercétine
>	Supérieur	TR	Trolox
µg	Microgramme	VAP	Vitesse de la trajectoire moyenne
µl	Microlitre	VCL	Vitesse curviligne
ABP	Androgen Binding Protein	VSL	Vitesse linéaire
CASA	Computer Assisted Semen Analysis	ALH	Amplitude du déplacement latéral de la tête
DMSO	Diméthyl sulfoxyde	ANOVA	Analyse de la variance
FAO	Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture	CNIAAG	Centre National de l'Insémination Artificielle et de l'Amélioration Génétique
BCF	Fréquence de battement	SD	Écart-type
E	Température ambiante	P	Seuil de significativité
FSH	Follicule Stimulating Hormon	pH	Degré d'acidité
HOST	Hypo-Osmotic Swelling Test	ITELV	Institut Technique des Elevages
IA	Insémination Artificielle	ADN	Acide désoxyribonucléique
LH	Luteinizing Hormon	°C	Degré Celsius
MDA	Malondialdéhyde	RA	Réaction acrosomique
ROS	Reactive Oxygen Species	LPO	Peroxydation lipidique
g	Gramme	AGPI	Acide gras polysaturs
h	Heure	DHA	Acide docosahexaemoique
LIN	Linéarité	UICN	Union International pour la conservation de la nature
Min	Minute	MPVI	Membrane péri vitelline interne
ml	Millilitre	IVF	Fécondation in vitro
MM	Motilité Massale	ICSI	Injection intra cytoplasmique
PM	Mobilité Progressive	CRBt	Centre de recherche en biotechnologie
PMT	Temps post-mortem	MESRS	Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
R	Température de réfrigération	INRA	Institut national de la recherche agronomique
Spz	Spermatozoïdes		
STR	Rectitude		
T	Température		

Introduction générale



Introduction Générale

Au fil des millénaires, des milliers de races d'animaux de ferme ont été développés pour s'adapter à des sites spécifiques. Aujourd'hui, de nombreux pays sont en train de perdre ces ressources génétiques essentielles, aussi bien, pour la sécurité alimentaire que pour le développement durable. La gestion durable des ressources génétiques animales est importante pour les besoins futurs en nourritures, fibres, engrais, traction animale et pour permettre aux éleveurs d'avoir la flexibilité de réagir à l'évolution des conditions de production. Les espèces animales domestiques et sauvages subissent un processus d'érosion profond dû à des causes naturelles et génétiques. Compte tenu du rôle du bétail dans la production de denrées alimentaires, d'énergie et de matières premières, etc., il est nécessaire de déployer de grands efforts pour la conservation de ces ressources génétiques (FAO, 2011 ; FAO, 2019).

La conservation génétique est une gestion, en vue de l'utilisation par l'homme, de la biosphère, dans le but de retirer le maximum d'avantages pour la génération actuelle, tout en maintenant son potentiel afin de pouvoir satisfaire les besoins et les aspirations des futures générations.

Tableau 1. Nombre de pays avec des programmes de conservation (FAO, 2008).

Région	Sous-Région	Rapports nationaux analysés	Nombre de pays avec conservation	
			<i>in vivo</i>	<i>in vitro</i>
Afrique	Australe	11	6	4
	Est	7	2	1
	Nord et Ouest	24	10	4
	Total partiel	42	18	9
Amérique	A. du Nord	2	2	2
	A. centrale	9	3	1
	A. du Sud	10	5	5
	Caraïbes	3	0	0
	Total partiel	24	10	8
Asie	Central	6	2	2
	Est	4	3	3
	Sud	7	4	3
	Sud-Est	8	4	3
	Total partiel	25	13	12
Europe et Caucase		39	33	25
Pacifique Sud-Ouest		11	2	1
Proche et moyen orient		7	1	0
Total		148	77	55

La conservation est donc un concept positif qui couvre la préservation, l'entretien, l'utilisation durable, la restauration et l'amélioration de l'environnement naturel (**Planchenault et Boutonnet, 1997**). Du point de vue de la biologie de la conservation, la préservation d'une population donnée dépend de sa taille effective (tableau 1) (**Taberlet et al., 2008 ; Groeneveld et al., 2010; Taberlet et al., 2011 ; Tanchev, 2015**).

En se fondant sur une enquête dans le monde entier, la liste mondiale de surveillance pour la diversité des animaux domestiques (**WWLDAD : 2, FAO/UNEP 1995**) classe 27% (390/1433) des races comme « menacées » ou « en danger » (**FAO, 2000**). Une extrapolation aux 5 000 races que l'on pense exister donne le chiffre de 1200 à 1600 races menacées sur la planète (**FAO, 2000**).

Au total, 6379 races de bétail appartenant à 30 espèces différentes ont été signalées dans la troisième édition de WWL-DAD (**FAO, 2000**). En 2008, 7040 races locales, 500 races régionales transfrontalières et 551 races transfrontières internationales ont été enregistrées dans le Système d'information sur la diversité des animaux domestiques (DAD-IS) (**FAO, 2009 ; Groeneveld et al., 2010**). Cela signifie que dans les prochaines décennies, jusqu'à 30% des espèces y compris de nombreux mammifères, oiseaux, reptiles, poissons et amphibiens, peuvent disparaître (**Pimm et al., 1995 ; Gerard, 2004 ; Rockstrom et al., 2009**).

Des données sur la taille de la population étaient disponibles pour 4183 races, dont 740 races étaient déjà disparues et 1335, soit 32% étaient classées comme étant à haut risque de perte et menacées d'extinction (**Pizzi et al., 2013**). Selon l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO), durant les cinq dernières années, 60 races ont disparu, soit une race par mois en moyenne. De nombreuses autres restent encore à identifier formellement et pourraient disparaître avant même que l'on ait eu le temps de les connaître. Globalement, on estime qu'environ 50 races, voire plus, disparaissent chaque année, soit une par semaine (**FAO, 2018**).

La FAO (**2020**) a déclaré que plus de 15 000 populations de races nationales (représentant plus de 8 800 races et environ 40 espèces) provenant de 182 pays sont répertoriées, et pour bien comprendre la situation des animaux d'élevage et domestiques au regard de la diversité génétique (figure 1), une observation de la proportion des races locales classées comme à risque, non à risque ou à niveau inconnu de risque d'extinction était indiquée.

Actuellement, plus de 20% des races documentées par des chiffres de population seraient menacées d'extinction (**FAO, 2020**).

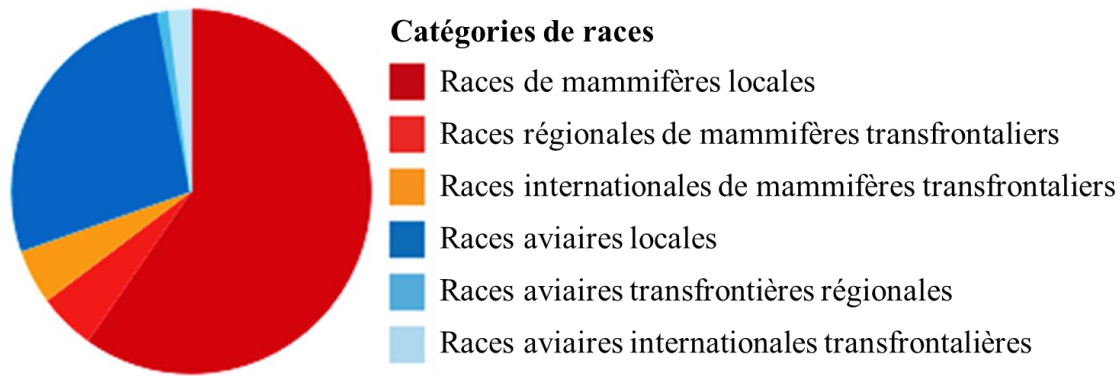


Figure 1. Répartition de la population locale dans le monde (FAO, 2020).

La première étape en conservation est d'être au courant des ressources génétiques animales qui existent dans un pays. Cette information peut être obtenue au départ à partir des enregistrements écrits ou oraux. Les projets de conservation demanderont cependant à ce que l'état actuel des ressources soit établi avec certitude. Cela consiste à faire un inventaire de toute la documentation existant sur ce sujet (Hall et Ruane, 1993).

Selon la FAO (2013), les arguments et les moyens en faveur de la conservation varient selon les régions. Dans les sociétés occidentales, les traditions et les valeurs culturelles sont des moteurs importants qui garantissent le développement de mesures de conservation des races rares et favorisent l'émergence de marchés de niche pour les produits de l'élevage. En revanche, dans les pays en développement, les préoccupations immédiates sont la sécurité alimentaire et le développement économique. Cependant, la plupart des pays en développement sont déjà en phase d'évolution économique et l'on peut penser que leurs économies seront dans l'avenir assez développées pour soutenir la conservation basée sur leur patrimoine culturel et autre (FAO, 2013).

Dans le cadre de la conservation et l'utilisation durable des ressources génétiques des animaux domestiques et sauvages, il est possible de considérer les techniques de conservation *in vivo* comme étant un ensemble de différentes approches dont, la conservation *in situ* qui permet l'évolution et l'adaptation continues d'une espèce donnée dans son environnement, recouvrant à son extrême le maintien des races au sein de leurs systèmes de production originaires (FAO, 2008). Cette approche est plus dynamique, mais on s'expose à la destruction de l'habitat de l'organisme par des catastrophes naturelles et/ou des interventions humaines. Alors que, la conservation *ex-situ* peut être utilisée pour garantir un accès facile et rapide au matériel de reproduction (FAO, 2008 ; FAO, 2011).

On peut dire alors que la conservation *in situ* des animaux d'élevage par l'usage continu de la part des éleveurs dans le système de production dans lequel ces animaux ont évolué ou sont habituellement présents et élevés. Tandis que, la conservation *ex-situ in vivo* fait référence à la conservation par le maintien de populations d'animaux vivants non élevés dans des conditions de gestion normales (parcs zoologiques et, dans certains cas, exploitations gouvernementales) et/ou en dehors de la zone dans laquelle ils ont évolué ou se trouvent encore de manière habituelle (FAO, 2018).

Contrairement à la conservation *ex-situ*, *in vitro* fait référence à une conservation externe de l'animal vivant dans un environnement artificiel, dans des conditions cryogéniques incluant, entre autres, la cryoconservation des embryons, du sperme, des ovocytes, des cellules ou des tissus somatiques ayant le potentiel de reconstituer dans l'avenir des animaux vivants (y compris des animaux utilisables pour l'introgession des gènes et le développement de races synthétiques) (FAO, 2018).

Selon Welles (2004) et Williams (2004) et FAO (2018), la diversité des mesures disponibles pour la conservation étant très large, il est parfois difficile de faire une distinction nette entre les approches *in-situ* et *ex-situ* *in vivo*. En plus il n'existe aucune formule spéciale pour réussir un programme de conservation. Alors que, plusieurs pays (48%), ne rapportent aucun programme de conservation *in vivo*. Une proportion encore plus grande (63%) déclare qu'ils n'ont aucun programme *in vitro* (tableau 2). La situation est variable de région en région. Les mesures de conservation sont beaucoup plus fréquentes en Europe, en Caucase, et en Amérique du Nord que dans les autres régions (FAO, 2007).

Tableau 2. Activité de conservation au niveau mondial (FAO, 2008).

Races	Bovin	Mouton	Chèvre	Porc	Poule	Cheval
Locales	897	995	512	541	1077	570
Transfrontaliers régionaux	93	134	47	25	55	63
Conservées <i>in vivo</i>	324	261	109	120	194	149
Conservées <i>in vitro</i>	225	111	44	140	87	33

Globalement, l'analyse des rapports nationaux suggère qu'une amélioration substantielle de la capacité générale pour la conservation, avec de nouveaux modèles institutionnels et la collaboration entre les institutions publiques, et entre ces dernières et les fermiers privés, est nécessaire si les menaces actuelles pour les ressources zoogénétiques doivent être correctement adressées.

La collaboration internationale et régionale joue un rôle clé dans l'implémentation de banques génétiques et d'autres mesures de conservation pour les races. Celle-ci serait facilitée si des protocoles d'accord (par exemple vis-à-vis des exigences sanitaires) pouvaient être établis pour les programmes de conservation *in vitro* qui opèrent à l'échelle internationale et pourquoi pas nationale (FAO, 2007).

Un premier pas crucial dans la conception des programmes de conservation des ressources zoogénétiques est la prise de décision sur ce qui doit être conservé. Par exemple, certains pays ont incité à prendre des mesures correctrices suite à la perte de ses ressources génétiques (FAO, 2012 ; FAO, 2017).

- **Maroc** : Des restrictions rigoureuses limitent la sélection croisée des ovins locaux avec des animaux d'importation (Boujenane, 1999, 2005).
- **République islamique d'Iran** : Un programme de promotion de la volaille indigène comprend une production sélective et la distribution aux familles rurales (FAO, 2006).
- **Pérou** : Des techniques moléculaires avancées ont été employées pour étudier l'origine et les liens génétiques entre les espèces de camélidés d'Amérique du Sud (alpaca, lama) (FAO, 2006).
- **Indonésie** : Les bovins de Bali sont conservés grâce à un programme in situ et à la cryoconservation du liquide séminale (FAO, 2006).
- **Chine** : Après la découverte de 79 races auparavant inconnues, le gouvernement a créé des zones de conservation et des banques de gènes pour la cryoconservation (FAO, 2006).
- **Afrique du Sud** : Des taureaux indigènes Nguni, bien adaptés aux conditions de production locale, sont fournis aux gardiens de troupeaux dépourvus de ressources (FAO, 2006).
- **Ouganda** : Le Centre national des ressources génétiques animales et de banque de données, créé en 2001, a lancé un programme de conservation et d'amélioration du bétail indigène, comme les bovins Ankole (FAO, 2008).
- **Japon** : La conservation des races bovines indigènes (ex. Mishima, Kagoshima Black, Agoh, Hinaidori et Tosa Jidori) (FAO, 2008).

L'Algérie, connue pour l'immensité de son territoire et la richesse de ses milieux, recèle des ressources animales extrêmement importantes, tant sur le plan qualitatif que quantitatif, et dont l'importance lui assurerait un développement agricole et rural d'une durabilité incontestable ; si elles étaient considérées à leur juste valeur. En Algérie, les ressources génétiques animales offrent une grande diversité de races quant à leur adaptation et leur aptitude de production dans leur environnement naturel.

La population faunistique connue totalise 4 963 taxons, dont un millier de vertébrés. Cette dernière catégorie est représentée notamment par les classes suivantes : les poissons (300), les reptiles (70), les oiseaux (378) et les mammifères (108) (FAO, 2014).

À partir des premiers développements de l'insémination artificielle (IA), vers la moitié des années 40 jusqu'aux récentes potentialités offertes par le stockage et le transfert d'ADN, les biotechnologies de la reproduction ont toujours contribué au transfert de matériel génétique *in vivo* et *in vitro*. Les techniques à présent accessibles et économiquement praticables pour la conservation *in vitro* des ressources zoogénétiques sont celles qui concernent la cryoconservation de cellules, d'embryons et de tissus de la reproduction (Oldenbroek, 1999).

Dans les pays développés, il existe une forte collaboration entre les banques de gènes et l'industrie de l'élevage et les associations de sélection pour la collection de matériel génétique. Dans les pays en développement qui mettent en œuvre les mesures de conservation *in vitro*, les activités sont limitées au stockage du sperme de certaines races locales de bovins et de moutons auprès d'institutions privées ou gouvernementales (FAO, 2005, 2017).

Selon Pizzi *et al.* (2013), afin de rationaliser le cryostockage des ressources zoogénétiques, certains pays européens ont créé des banques nationales de gènes : Autriche (banque autrichienne de gènes pour l'agriculture des animaux), La France (Cryobanque Nationale), Pays-Bas (Centre pour les ressources génétiques - banque de gènes) et les pays nordiques (Danemark, Finlande, Islande, Norvège et Suède : Viking Genetics le centre AI danois suédois finlandais).

La cryoconservation est la première étape pour la création d'une banque de gènes, c'est une conservation de matériel génétique à une température extrêmement basse (dans l'azote liquide à -196 °C), à laquelle toute activité biologique est suspendue (tableau 3). Cette méthode permet une conservation sans détérioration pendant au moins plusieurs milliers d'années ; et probablement beaucoup plus longtemps. Cela signifie que la richesse de la diversité génétique d'aujourd'hui peut être stockée à long terme dans un coffre-fort biologique.

Tableau 3. État actuel des techniques de cryoconservation par espèce (FAO, 2017).

Espèces	Bovin	Mouton	Chèvre	Lapin	Cheval	Porc	Poule
Sperme	+	+	+	+	+	+	+
Ovocytes	+	0	0	0	0	0	-
Embryons	+	+	+	+	0	0	-
Cellules somatiques	+	0	0	0	0	0	-

Avec l'état de l'art actuel, trois sortes de matériels biologiques permettent la re-création fiable d'individus vivants, le sperme, les ovocytes et les embryons. La production de la semence est liée à la disposition d'animaux spécialement entraînés à être collectés à l'aide d'un vagin artificiel, ou par électro éjaculation (Guérin *et al.*, 2003 ; Noel, 2019).

La récolte du sperme constitue la première opération de l'insémination artificielle, l'objectif est de récolter le maximum de sperme avec une meilleure qualité ; les méthodes utilisées pour la récolte de la semence ont subi plusieurs modifications au fil des années (Briffaut, 2007), la récolte à l'aide d'un vagin artificiel est le procédé le plus utilisé. C'est le procédé de récolte du sperme qui se rapproche le plus des conditions naturelles d'éjaculation (Boly, 1986 ; Marc, 2015 ; Noel, 2019), il présente l'avantage de mimer au mieux l'accouplement (Briffaut, 2007).

D'autres méthodes de récolte comme la masturbation et l'électro-éjaculation, la première consistent à provoquer l'éjaculation par excitation mécanique du pénis, elle nécessite une méthode de contention de l'animal de manière à dégager la région génitale (**Boly, 1986 ; Marc, 2015**), quant à la deuxième, elle a pour principe de faire passer un courant électrique à travers les régions du plexus mésentérique postérieure et des ganglions sympathiques et parasympathiques reliés anatomiquement à ce plexus (**Michel, 2009 ; Marc, 2015**). Une autre méthode consistant en un prélèvement dans le vagin de la femelle reste peu utilisée à cause de ses inconvénients : récupération incomplète de l'éjaculat et pollution du sperme par des bactéries ou des sécrétions vaginales (**Ortavant, 1959**).

La récolte au vagin artificiel fournissait la plus grande concentration et le plus grand nombre de spermatozoïdes. L'électro-éjaculation donnant le plus grand volume, aussi une plus faible concentration en spermatozoïdes recueillie, et un nombre total de spermatozoïdes légèrement inférieur à celui récolté au vagin artificiel (**Ortavant, 1959 ; Terrill, 2011 ; Marc, 2015**). La récolte au vagin artificiel nécessite l'entraînement des animaux, tandis que la méthode d'électro-éjaculation qui est utilisée comme alternative, ne nécessite pas l'entraînement des animaux (**Jimenez-Rabadan et al., 2012**). Les animaux morts (**Prieto et al., 2014**) ou souffrant de dysfonctionnement érectile (**Kapoor et al., 2015**) ne sont pas adaptés au prélèvement de sperme par vagin artificiel ou électro-éjaculation.

Selon **Terrill (2011)**, l'insémination avec une semence récoltée par ces différentes méthodes a donné de bons et de très proches résultats, dans le nombre de femelles gestantes ou dans la prolificité. Par contre, un certain nombre d'animaux génétiquement intéressants non entraînés à la collecte sont difficilement utilisables en insémination artificiel (**Guérin et al., 2003**). Le recours à la récolte du sperme épидидymaire est l'une des méthodes d'actualité utilisée par plusieurs auteurs (tableau 4), à différents âges et chez différentes espèces animales.

L'objectif de cette étude, est d'accroître nos connaissances dans les spécificités des méthodes de récolte et de conservation du sperme épидидymaire chez plusieurs espèces animales (domestiques et sauvages) ainsi que son utilisation pour la création de banques génétiques. Ces dernières garantiront la conservation et l'utilisation durable des ressources génétiques à conserver ou celles menacées de disparition. En outre cette technique peut être amplifiée par la récolte des descendants males abattus issus des meilleurs géniteurs viandeux ou laitiers (bovins, caprins et ovins) ou morts (mort subite ou par accident pour les espèces sauvages ou en captivité).

Tableau 4. Utilisation du sperme épидидymaire par espèces

Espèces	Références
Bélier	Linot ,1971 ; Dott <i>et al.</i> ,1979 ; Gatti <i>et al.</i> , 2000 ; Guérin <i>et al.</i> ,2003 ; Kaabi <i>et al.</i> , 2003 ; Boediono et Rizal, 2004 ; Martinez Pastor <i>et al.</i> , 2004; Rizal <i>et al.</i> , 2004 ; Bester, 2006 ; Ehling <i>et al.</i> , 2006; Shakeri <i>et al.</i> , 2008 ; Garcia-Alvarez <i>et al.</i> , 2009 ; Karja <i>et al.</i> , 2010 ; Lone <i>et al.</i> , 2011 ; Tamayo-Canul, 2011.
Renard	Verdier, 2002.
Cheval	Cary <i>et al.</i> , 2004 ; Heise, 2010.
Chat	Julienne Posière, 2002 ; Yulnawati Dan et Setiadi, 2005.
Camelin	Abdel-Khalek <i>et al.</i> , 2009 ; Khalil Rezk, 2009.
Taureau	Orgebin-Crist <i>et al.</i> , 1962 ; Barati <i>et al.</i> , 2009 ; Michel, 2009 ; Rizal, 2009 ; Yulnawati <i>et al.</i> , 2009 ; Parera <i>et al.</i> , 2010
Bouc	Datta <i>et al.</i> , 2009 ; Ranjna <i>et al.</i> , 2011.
Lapin	Dott <i>et al.</i> , 1979.
Singe rhésus	Dong <i>et al.</i> , 2008.
Sanglier	Oyeyemi <i>et al.</i> , 2005.
Rat	Carla <i>et al.</i> , 2011.
Cerf	Guérin <i>et al.</i> , 2003 ; Soler <i>et al.</i> , 2003 ; Malo <i>et al.</i> , 2005 ; Martinez Pastor <i>et al.</i> , 2005 ; Martinez Pastor <i>et al.</i> , 2006.
Tegu blanc	Young <i>et al.</i> , 2013.
Singes rhésus	Dong <i>et al.</i> , 2008.
Crocodiles	Johnston <i>et al.</i> , 2014
Bouquetins	Blash <i>et al.</i> , 2000 ; Santiago-Moreno <i>et al.</i> , 2006.

Ce matériel génétique sera d'un apport certain pour le maintien de la diversité animale et dans l'amélioration génétique des performances des populations animales par le biais des biotechnologies de la reproduction comme l'insémination artificielle (IA), la fécondation in vitro (IVF), et l'injection intra cytoplasmique (ICSI) (Tsutsui *et al.*, 2003 ; Tebet *et al.*, 2006 ; Khalil Rezk, 2009 ; Korochkina *et al.*, 2014 ; Marc, 2015 ; Noel, 2019).

Selon Garcia-Alvarez *et al.* (2009), il n'y a aucune différence entre une semence récoltée par électro-éjaculation et celle récoltée en post-mortem (sperme épидидymaire). Sachant que chez tous les mammifères, les spermatozoïdes testiculaires ne sont ni motiles, ni fécondants, le pouvoir fécondant des spermatozoïdes apparaît dans l'épидидyme (Guérin *et al.*, 2003 ; Axné, 2006 ; Marc, 2015). Une petite comparaison entre le sperme récolté par électro-éjaculation, vagin artificiel et celui récolté au niveau de la queue de l'épидидyme (sperme épидидymaire) ; les spermatozoïdes épидидymaires sont entièrement prêts pour subir une fécondation normale et un développement embryonnaire et fœtal (Morris, 2002 ; Ehling *et al.*, 2006 ; Monteiro *et al.*, 2011 ; Lone *et al.*, 2011).

La récolte du sperme épидидymaire est une méthode qui consiste à prélever la semence directement de l'épididyme, sachant que la physiologie de l'épididyme a fait l'objet d'un nombre considérable de travaux expérimentaux visant à mettre en lumière le rôle important que joue cet organe dans le déclenchement de la mobilité des spermatozoïdes au cours de leur transit (**Schoysman et al., 2012**).

L'épididyme est un long canal contourné accolé à la face postérieure du testicule (plaqué sur l'arrière du testicule auquel il fait suite) (figure 2), reliant les canaux efférents au canal déférent (**Bonne et al., 1988 ; Pietrement, 2006 ; Brault et Castellier, 2009**). Il est connecté à la gonade mâle via le rete-testis et les canaux efférents et débouchant sur le canal déférent (figure 2) (**Drevet, 2012**), d'aspect pelotonné (**Pietrement, 2006**), sa longueur est de 3-6 m chez l'homme (**Grignard, 2005 ; Robaire et al., 2006**), 40-60 m chez le bélier (**Grignard, 2005 ; Bister, 2009**), 80 m chez l'étalon (**Grignard, 2005**), 45 m chez le taureau, 7 m chez le chien et 2 m chez le chat (**Dacheux et al., 2014 ; Marc, 2015**).

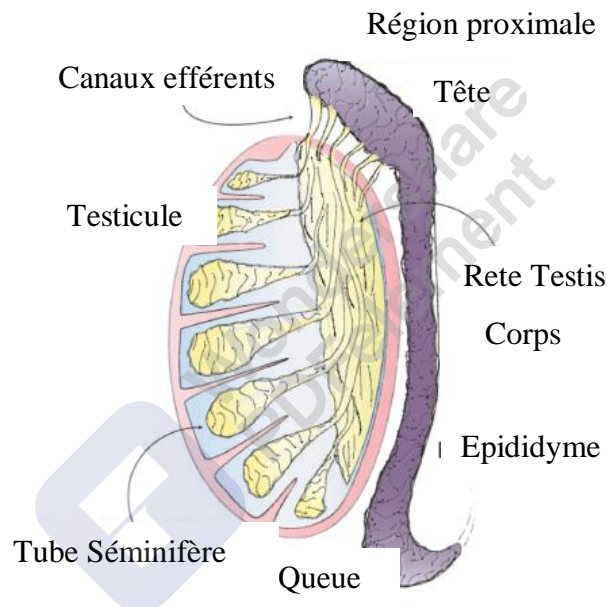


Figure 2. Anatomie des testicules et de l'épididyme (**Emma et al., 2020**)

Il est divisé en trois régions anatomiquement distinctes, la tête (région proximale), reliée au hile du testicule par les canaux efférents et leur faisant suite ; le corps (partie médiane) ; la queue (région distale), en continuité avec le canal déférent (figure 3) (**Soranzo, 1982 ; Bonne et al., 1988 ; Gatti et al., 2004 ; Britan, 2006 ; Pietrement, 2006 ; Fuertes, 2008 ; Brault et Castellier, 2009 ; Cornwall, 2009 ; Pellestor, 2012 ; Marc, 2015**). Alors que la tête et le corps épидидymaires sont responsables de la maturation spermatique, la queue est plus impliquée dans le stockage assurant qu'un nombre suffisant de gamètes soit présent à chaque éjaculation (**Grignard, 2005**).

La partie caudale de l'épididyme sert d'entrepôt où les spermatozoïdes matures sont conservés pour des durées différentes. Les conditions dans la queue d'épididyme sont particulièrement propices à la survie des spermatozoïdes (**Voglmayr et al., 2006**).

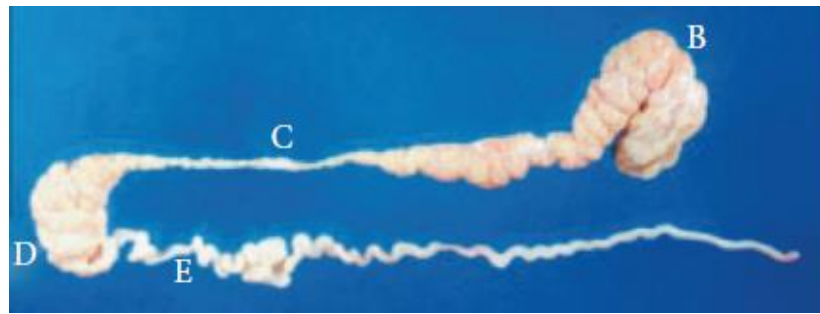


Figure 3. Photos prises à partir d'un épидидyme de taureau. Différentes coupes anatomiques sont identifiées : tête (b), corps (c) queue (d) canal déférent (E) (Caballero *et al.*, 2011).

Le canal épидидymaire comprend deux compartiments : un épithélium pseudostratifié, entouré de 2 à 6 couches de fibres musculaires lisses et du tissu conjonctif (il contient des terminaisons nerveuses et des capillaires sanguins), et une lumière bordée par cet épithélium (Britan, 2006 ; Dacheux *et al.*, 2016). Du point de vue histologique, différents types cellulaires constituent l'épithélium épидидymaire.

Cinq types cellulaires entrent dans la composition de l'épithélium épидидymaire présentant des caractéristiques structurales et fonctionnelles très variées de la région proximale à la région distale du tubule (Grignard, 2005 ; Britan, 2006), il y a une variation considérable entre les espèces dans la quantité du sperme gonadique stocké dans l'épидидyme d'où l'intérêt du choix du lieu de récolte. Par exemple, les spermatozoïdes stockés dans la queue de l'épидидyme du taureau, de l'étalon et du bélier représentent, respectivement, 9, 14 et 6 jours de la production testiculaire de sperme (Jones *et al.*, 2007 ; Dacheux *et al.*, 2016). Certaines cellules sont retrouvées sur toute la longueur du canal, alors que d'autres sont plus spécifiques d'une région, les types cellulaires retrouvés dans l'épithélium épидидymaire sont : les cellules principales, les cellules apicales, les cellules claires, les cellules en halo, et les cellules basales (Grignard, 2005).

L'épидидyme joue plusieurs rôles essentiels dans la fertilité mâle (Britan, 2006 ; Dubée et Daniel, 2007), il est impliqué dans le transport, la concentration, la maturation et le stockage des spermatozoïdes (Grignard, 2005). Les spermatozoïdes acquièrent leur fertilité et leur mobilité progressive pendant le transit épидидymaire (Guérin *et al.*, 2003 ; Dacheux *et al.*, 2016) par le phénomène de maturation épидидymaire. La maturation des spermatozoïdes dans l'épидидyme se caractérise par une succession de modifications morphologiques et physiologiques qui apparaissent sur les gamètes dans des régions épидидymaires très précises (Dacheux et Paquignon, 1987 ; De Pauw, 2000 ; Dacheux *et al.*, 2016), la maturation des gamètes dans l'épидидyme est une phase décisive dans l'acquisition du pouvoir fécondant.

Les critères de qualité qui sont généralement utilisés pour juger de l'état de la semence (pourcentage de motilité, motilité progressive) permettent également d'apprécier le fonctionnement de l'épididyme (**Dachaux et Paquignon, 1987 ; Robaire et al., 2006**). Alors l'épididyme est l'organe où les spermatozoïdes passent après leur voyage dans les canaux efférents du testicule. Quand ils sortent de ces canaux, ils deviennent immobiles et non fertiles ; le passage à travers l'épididyme va les rendre mobiles et fertiles, les transformant ainsi en spermatozoïdes matures.

Selon **Thibault et Levasseur (2001)**, la concentration en spermatozoïdes dans le fluide du rete-testis (débit de 4 à 20 ul/gr de testicule/heure) véhicule des spermatozoïdes immobiles dont la concentration se situe entre 30 millions/ml (rat, lapin) et 300 millions/ml (bélier, singe). La majeure partie de ce fluide est réabsorbée dans la tête de l'épididyme, à la sortie duquel les spermatozoïdes sont dans une suspension très dense (**Baril et al., 1993 ; Noblanc et al., 2012**).

La transition entre le spermatozoïde immobile et non fertile et les spermatozoïdes mobiles et féconds se produit à des endroits assez bien définis de l'épididyme (**Emma et al., 2020**). Chez le bélier, la fin de la partie moyenne du corps et la queue proximale, est la partie où le spermatozoïde devient mobile et fécondant (**Baril et al., 1993**), alors que chez l'homme cela se produit au niveau de la région médiane du corps de l'épididyme (**Sullivan et Mieusset, 2016**). Un faible pourcentage de grossesses a été obtenu avec des spermatozoïdes prélevés dans le segment proximal ; le taux de réussite a augmenté avec l'utilisation de spermatozoïdes prélevés de la partie distale de l'épididyme (**Sullivan et Mieusset, 2016**).

Selon **Marc, (2015)**, chez le chat et le cheval, tout comme chez l'homme, seuls les spermatozoïdes présents dans la partie distale de l'épididyme sont éjaculés, alors que **Noblanc et al. (2012)** dénoncent que chez tous les mammifères, le stockage des spermatozoïdes (matures) entre deux éjaculations sera dans sa partie terminale (queue). Chez le taureau et l'étalon, le nombre de spermatozoïdes stockés dans la queue est suffisant pour dix éjaculations successives (**Sullivan et al., 2007**).

Les spermatozoïdes immatures rejoignent l'épididyme où ils y séjournent quelques jours. Dans la tête de l'épididyme, les spermatozoïdes ne sont ni mobiles, ni fertiles et la gouttelette cytoplasmique proximale est présente (**Marc, 2015**). Dans le corps de l'épididyme, les spermatozoïdes acquièrent leur mobilité. L'apparition de la mobilité fait suite à l'absorption de carnitine au niveau de la tête de l'épididyme. À ce stade, la gouttelette cytoplasmique se trouve sur l'extrémité distale de la pièce intermédiaire et les spermatozoïdes peuvent se lier à l'ovocyte et sont capables de le féconder (**Marc, 2015**).

C'est seulement à partir du début de la queue de l'épididyme que les spermatozoïdes de la plupart des mammifères possèdent la double aptitude, mobilité et fixation à la zone pellucide (**Jauzein, 2004**). La mobilité des spermatozoïdes de la tête de l'épididyme est circulaire, tandis que les spermatozoïdes de la queue de l'épididyme sont progressifs (**Robaire et al., 2006**). Bien que le temps de transit normal chez les mammifères à travers la queue de l'épididyme soit de l'ordre de 3 à 10 jours, les spermatozoïdes peuvent être stockés dans ce tissu pendant de longues périodes allant au-delà de 30 jours. Chez les chauves-souris, les spermatozoïdes peuvent être stockés dans la queue de l'épididyme pendant de nombreux mois et conserver leur fonction (**Robaire et al., 2006**).

Beaucoup de changements interviennent pendant le transit épididymaire : le noyau se stabilise, les membranes sont profondément modifiées, l'appareil locomoteur devient efficace, la gouttelette cytoplasmique (qui contient des enzymes) est perdue (**Baril et al., 1993**). Des centaines de protéines épididymaires ont déjà été identifiées dans le liquide épididymaire de différentes espèces. Mais il n'y a jusqu'à présent pas plus de vingt protéines présentes en forte concentration, représentant 80 à 90% des protéines luminales (**Dacheux et Dacheux, 2014**).

Les protéines peuvent intervenir de différentes façons dans la maturation spermatique. Elles peuvent modifier de façon directe ou indirecte la composition de la membrane plasmique, ou contribuer à la préservation de l'intégrité cellulaire (**Hinton et al., 1995 ; Lefebvre, 2009 ; Noblanc et al., 2012**). Plusieurs protéines produites par l'épididyme ont été décrites chez diverses espèces de mammifères (figure 4) : rat, souris, hamster, sanglier, bélier, étalon et humain. Les principales protéines sécrétées de l'épididyme des mammifères sont la lactoferrine, la lipocaline 5, la clusterine, la glutathion peroxydase 5, la prostaglandine D2 synthase, la transferrine, la protéine de liaison à la phosphoéthanolamine 4, la bêta-N-acétylhexosaminidase, la glutathion S transferase, la gelsoline, l'actine et la bêta galactosidase (**Maňásková-Postlerová et al., 2011 ; Dacheux et Dacheux, 2014**).

Chez l'homme en particulier, 77% des protéines luminales totales sont représentées par l'albumine (43,8%), la clusterine (7,6%), NCP2/CTP/HE1 (6%), la lactoferrine (5,9%), la protéine de matrice extracellulaire (3,2%), α 1-antitrypsine (2,7%), la prostaglandine D2 synthase (2,2%), la transferrine (1,3%) et la protéine de liaison à l'actine (1,2%) (**Dacheux et al., 2006**).

Chez le bélier 70% de l'activité de sécrétion de l'épididyme est liée à quatre protéines : la clusterine, la lactoferrine, la GPX (glutathion peroxydase), PDGS (prostaglandin D2 synthase) et la Glucosidase (**Syntin et al., 1996 ; Grignard, 2005 ; Dacheux et al., 2010**). Notons aussi que la région épididymaire productrice de ces protéines peut être différente entre espèces (figure 4) (**Grignard, 2005 ; Dacheux et al., 2016**).

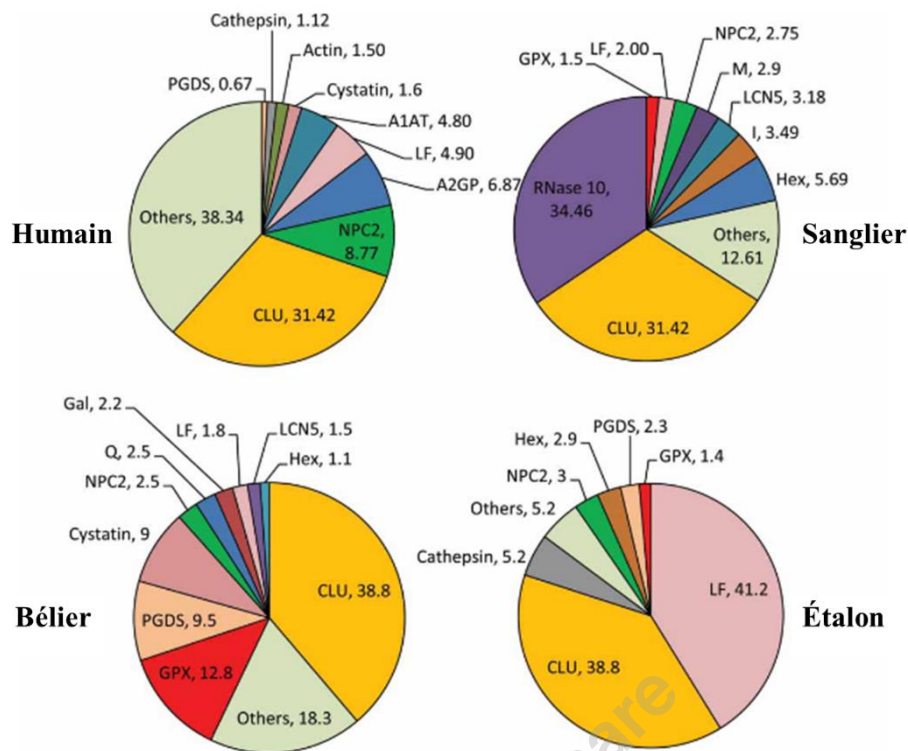


Figure 4. Distribution des principales protéines sécrétées par l'épididyme de l'homme, sanglier, bélier et du cheval. Pour chaque protéine, la quantité sécrétée est exprimée en pourcentage de la protéine totale marquée sécrétée par l'épididyme : A1AT, alpha 1 antitrypsine ; A2GP, alpha 2 glycoprotéine ; CLU, clusterine ; GPX, glutathion peroxydase ; Hex, bêta-N-acétyl-hexosaminidase ; LCN5, lipocaline 5 ; LF, lactoferrine ; NPC2, maladie de Niemann-Pick, type C2 ; PGDS, prostaglandine-D2 synthase ; I, M, protéines non identifiées (Dacheux *et al.*, 2016)

Chez le taureau, Moura *et al.* (2010) ont identifié 114 des protéines dans le liquide épididymaire de la queue, et les protéines les plus abondantes étaient l'albumine (21,1%), la protéine sécrétoire épididymaire E1 (10,5%), la prostaglandine D-synthase (7,6%) et la gelsoline (6%). Chez l'étalon, la concentration de protéines est de 35 mg/ml dans la tête proximale est environ 5 fois plus élevée que dans le liquide testiculaire (Fouchécourt *et al.*, 2000). La concentration augmente jusqu'à une valeur maximale de 60-80 mg/ml dans la tête distale, puis diminue progressivement vers le corps et la queue pour atteindre 20-30 mg/ml.

La tête était la région la plus active, représentant 73% de la sécrétion totale de l'épididyme. Le corps était le deuxième plus actif, avec 20,5 % de la sécrétion, suivi par la queue, 6,5 %. La lactoferrine et la clusterine étaient les plus abondantes (Souza *et al.*, 2017).

La survie des spermatozoïdes pendant le transit dépend de la production des hormones et elle est Androgène-dépendante, lesquelles stimulent les cellules épididymaires (Baril *et al.*, 1993 ; Emma *et al.*, 2020). Les androgènes sont également responsables de la régulation de la synthèse de certaines protéines, mais pas toutes, qui sont synthétisées et sécrétées par les cellules épididymaires (Emma *et al.*, 2020).

Pendant la première ou les deux premières semaines de la vie post-testiculaire, les spermatozoïdes sont enfermés dans l'épididyme, mais subissent néanmoins des modifications de leur environnement jusqu'à l'éjaculation. Ces subtils changements séquentiels du milieu luminale sont le résultat d'une spécialisation régionalisée de l'épithélium épидидymaire (**Souza et al., 2017**).

Les sécrétions et l'endocytose entraînent une modification intense du profil protéique du liquide épидидymaire, exposant les gamètes à des facteurs qui modifient la physiologie des spermatozoïdes. De plus, les sécrétions apoclines des cellules principales produisent des épидидymosomes qui délivrent des protéines cibles, des ARNm et des lipides aux spermatozoïdes, un événement fondamental pour la reconnaissance et la fusion des gamètes (**Souza et al., 2017 ; Emma et al., 2020**), sachant que la composition protéique des épидидymosomes est complexe et variée le long de l'épididyme.

Chez le bélier (**Gatti et al., 2004 ; Gatti et al., 2005**) et le taureau (**Frenette et al., 2002 ; Frenette et al., 2003**), la concentration en protéines des épидидymosomes diffère des liquides ou des spermatozoïdes recueillis dans le même segment de l'épididyme. Chez les bovins, les protéines des épидидymosomes collectés au niveau de la tête et la queue de l'épididyme sont composées respectivement de 555 et 438 protéines, étant donné que 231 protéines sont communes aux deux types d'épididymosomes (**Girouard et al., 2011 ; Souza et al., 2017**).

Selon la recherche, les processus moléculaires à l'origine de la maturation des spermatozoïdes dépendent des vésicules, ainsi que de plusieurs autres composants lumineux, permettant ainsi de mieux comprendre la maturation des spermatozoïdes dans l'épididyme, ouvrant la voie à la découverte de nouveaux marqueurs de la qualité et de la fertilité du sperme (**Souza et al., 2017**). L'épididyme permet aux spermatozoïdes d'acquérir un pouvoir fécondant et de générer un embryon de meilleure qualité (**Cheema et al., 2010**). On apprécie la fertilité des spermatozoïdes par deux importantes techniques, l'insémination artificielle et la fécondation *in vitro* (**Gatti et al., 2004**).

Trois méthodes sont utilisées pour la récolte de spermatozoïdes à partir d'animaux morts ; « Flot-up », le principe de cette technique est la réalisation de plusieurs incisions longitudinales au niveau de la queue et la pulvérisation de cette dernière avec du sérum physiologique. La macération ; cette méthode consiste à placer la queue de l'épididyme dans une boîte de pétri et réaliser une macération pendant 10 minutes (**Khalil Rezk, 2009**) ; la troisième méthode est le rinçage (flusching, perfusion rétrograde) ; son principe est de déplacer le sperme épидидymaire dans une direction du passage de sperme (**Guérin et al., 2003 ; Khalil Rezk, 2009 ; Turri et al., 2012**).

Deux méthodes de prélèvement sur des animaux vivants nécessitent une chirurgie : la Microsurgical Epididymal Sperm Aspiration (MESA) : terme utilisé pour représenter les techniques microchirurgicales d'aspiration de spermatozoïdes à partir de l'épididyme. Des aspirations séquentielles (plusieurs sites de ponction) peuvent être effectuées jusqu'à ce que des spermatozoïdes mobiles soient obtenus. Classiquement, la MESA apporte un nombre suffisant de spermatozoïdes mobiles à la fois pour l'utilisation immédiate et/ou pour la cryoconservation (**Khalil Rezk, 2009 ; Garcia-Legname, 2010 ; Li abador, 2011**).

Percutaneous Epididymal Sperm Aspiration (PESA) est la technique la moins invasive et peut se réaliser sous anesthésie locale ou générale. Cette technique d'aspiration épидидymaire performante ne nécessite ni exploration chirurgicale scrotale ni expertise microchirurgicale. Une aiguille Butterfly, fixée à une seringue de 20 ml, est introduite dans l'épididyme, et aspire doucement le fluide. La procédure est répétée jusqu'à l'obtention de volumes adéquats de fluide épидидymaire (**Khalil Rezk, 2009 ; Llabador, 2011**).

La récolte à partir de donneurs morts est plus facile, parce que le testicule tout entier peut être facilement prélevé pour le traitement (**Khalil Rezk, 2009**). L'ablation chirurgicale de l'épididyme est plus efficace, elle nous permet de récolter du sperme avec une très bonne concentration (**Heise, 2010**). Les spermatozoïdes épидидymaires sont entièrement prêts pour subir une fécondation normale et un développement embryonnaire et fœtal (**Ehling et al., 2006 ; Lone et al., 2011**). Il faut mentionner que le majeur problème reste l'unique récolte effectuée en post-abattage. Toutefois cette technique peut être considérée comme un complément de récolte d'un reproducteur à travers sa descendance mâle qui est destinée à la production de viande.

Henri et al., (2011) ont prouvé que l'insémination avec un sperme épидидymaire, chez 10 béliers a donné les résultats suivants :

- Un nombre élevé de femelles gestantes (4/10) ayant une prolificité de 2.3 et avec une insémination cervicale, et de 7/10 ayant une prolificité de 3.1 avec une insémination par laparoscopie, contrairement à une insémination par voie cervicale avec une semence éjaculée (0/10) et laparoscopique (6/10).
- La semence épидидymaire donne 20 milliards de spermatozoïdes par bélier ce qui donne 108 doses de 0.2 milliard de spermatozoïdes/dose.

Les spermatozoïdes épидидymaires bovins utilisés dans la FIV ont donné lieu à une fertilisation, un clivage et un développement des blastocystes nettement améliorés à 83,7 %, 80,2 et 30,6 % par rapport au sperme éjaculé, à 50,1 %, 39,9 % et 10,6 %, respectivement (**Katska et al., 1996**).

Plusieurs auteurs ont comparé différentes méthodes de récolte pour optimiser la technique d'extraction de sperme épидидymaire et n'ont pas trouvé de différences significatives entre les méthodes : La méthode rétrograde (flushing) et flot-up ont été testées chez les étalons (**Cary et al., 2004**), le cerf rouge et le bouquetin (**Martinez-Pastor et al., 2006 ; Santiago-Moreno et al., 2009**). Néanmoins, **Martinez- Pastor et al. (2006)** et **Santiago-Moreno et al. (2009)** ont conclu qu'il serait plus recommandable d'utiliser la méthode rétrograde pour récupérer du sperme au niveau de la queue de l'épididyme.

Selon les résultats de **Turri et al. (2012)**, Chez le taureau, le sperme de la queue de l'épididyme, récolté par la technique rétrograde (flushing) est de meilleure qualité que celui obtenu par la technique de flot-up. Aucune différence significative n'a été constatée entre la qualité du sperme épидидymaire (queue) frais et après la congélation-décongélation entre les méthodes de collecte, bien que les niveaux moyens de qualité du sperme avec la méthode de rinçage aient été légèrement meilleurs que celle de la méthode de flot-up chez le chien (**Hori et al., 2015**).

La méthode de rinçage est simple et n'affecte pas la qualité du sperme après la congélation et la décongélation, et est donc, une méthode utile pour recueillir le sperme du chien de la queue de l'épididyme. Cependant, **Hori et al. (2015)** ont suggéré que le flot-up doit être utilisé lorsque le rinçage est impossible.

La méthode d'extraction n'a pas d'influence sur la concentration et le pourcentage des anomalies des spermatozoïdes récupérés, comme l'ont observé **Cary et al. (2004)** chez le cheval ; et par **Martínez-Pastor et al. (2006)** chez le cerf rouge. Les travaux de **Stout (2012)** chez le taureau, confirment que la concentration du sperme épидидymaire (queue) ($1,24 \times 10^9$ spz/ml) est supérieure à la concentration d'un éjaculat ($0,76 \times 10^9$ spz/ml), parce que l'on obtient des spermatozoïdes sans plasma séminal (**Parera, 2009**). Contrairement, la mobilité, et la viabilité sont meilleures lors de la récolte avec la méthode rétrograde que la flot-up selon **Alapati et al. (2009)** et **Turri et al. (2012)**. Selon les mêmes auteurs, chez le taureau la mobilité varie de 61 % à 94,5 %, avec une moyenne de 80,32%.

La technique de flot-up présente certains inconvénients par rapport à la rétrograde, comme la présence d'hématies et des débris tissulaires (lors d'incision) ; de plus la centrifugation a des effets négatifs sur la vitalité, la mobilité et la structure acrosomique des spermatozoïdes, elle peut provoquer une activité enzymatique qui entraîne la réduction de la fertilité (**Khalil Rezk, 2009 ; Bertol, 2016**). Par contre la technique flot-up est plus rapide et facile que la technique rétrograde qui nécessite plus de temps et des laborantins qualifiés (**Bertol, 2016**).

García Álvarez et al., (2009) et **Stout (2012)** ont constaté que la motilité des spermatozoïdes épидидymaires chez le taureau et le bélier (72.2%, 58,8%) était significativement supérieure à celle du sperme éjaculé (50,9% ; 40.2%) après cryoconservation (-196°C). **Varisli et al., (2009) ; Tsikis et al., (2018) et Martínez-fresneda et al., (2019)** ont constaté que le sperme épидидymaire de bélier était plus résistant que le sperme éjaculé au stress osmotique, au choc thermique et à l'exposition aux agents cryoprotecteurs, ceci est pareil pour le taureau et d'étalon trouvé par **Cunha et al.(2016) ; Martínez-fresneda et al. (2019) et Pérez-Patiño et al. (2019)**.

Les méthodes d'obtention des gamètes au niveau de l'épididyme, dépendent de l'espèce animale, de la taille de l'épididyme et de l'expérience du laborantin. La rétrograde ou flusching est utilisée pour les grands animaux, qui ont des testicules plus gros et un épидидyme plus large. Elle a été utilisée avec succès chez les chevaux et les bovins, par contre, la flot-up est la plus appropriée aux petits animaux, en raison de la taille anatomique de l'épididyme (**Bertol, 2016**).

Lorsque les animaux mâles meurent de façon inattendue, la cryoconservation du sperme n'est pas possible immédiatement, et le stockage temporel des épидидymes à 4 °C peut aider à préserver le génome de l'individu (**Karja et al., 2011**). Par conséquent, il existe de nombreuses études qui se concentrent sur le développement de la qualité des spermatozoïdes épидидymaires congelés-décongelés.

Deux périodes critiques pour assurer une bonne conservation génétique des animaux : Premièrement, il faut tenir compte de la durée entre la mort de l'animal et l'autopsie. La seconde est la durée entre l'ablation des gonades et le prélèvement des spermatozoïdes au laboratoire. Le temps entre la mort et l'autopsie est assez difficile à contrôler. En général, le sperme épидидymaire reste viable pendant plusieurs jours après la mort de l'animal. Cependant, cette période dépend de l'espèce et de la condition environnementale des testicules. Le sperme épидидymaire récolté après stockage à 5°C, a montré une meilleure mobilité, et un plus faible pourcentage de formes anormales chez le bélier que la conservation de l'épididyme à température ambiante après 24 h et 48 h (**Karja et al., 2011**).

La raison de survie des spermatozoïdes dans l'épididyme à 4°C n'est pas claire, le fluide épидидymaire peut contenir un facteur protecteur contre le choc dû au froid telle la lécithine. De plus, le milieu qui entoure les spermatozoïdes diffère par rapport au sperme éjaculé, comme le liquide épидидymaire ne contient pas de sécrétions des glandes annexes, ces différences entre le liquide séminal et le liquide épидидymaire ont été signalées comme affectant la résistance à la congélation chez différentes espèces (**Lucia et al., 2019**).

Par ailleurs, en gardant les testicules et l'épididyme à l'intérieur du scrotum, cela devrait être suffisant pour protéger la queue de l'épididyme de la dessiccation (**Karja et al., 2011**). Sachant que les tissus sont le siège de nombreux changements et que l'autolyse a lieu rapidement, les organes reproducteurs ont besoin d'être réfrigérés à 5°C rapidement après la mort et les spermatozoïdes mobiles peuvent être récupérés jusqu'à 12h plus tard (**Arnold, 2004**). Aucune différence n'a été constatée dans la comparaison entre les spermatozoïdes épидидymaires prélevés immédiatement ou après 24 h de stockage à 4° C du testicule, ce qui soutient l'hypothèse selon laquelle il est possible de stocker l'épididyme avant la récolte des spermatozoïdes.

Ces résultats sont en accord avec d'autres études qui soutiennent le refroidissement à 5°C, qui est le meilleur moyen d'arrêter la détérioration des spermatozoïdes épидидymaires qui semble se produire même dans les heures suivant la collecte (**Vieira et al., 2013 ; Falomo et al., 2016**). Les spermatozoïdes de mammifères peuvent être conservés sans être congelés pendant une courte durée, de quelques heures à quelques jours (2-3J) (à 4°C ou entre 15-20°C) (**Lusignan, 2011**), soit immédiatement après prélèvement de l'épididyme, soit après conservation de celui-ci à 4°C (**Guérin et al., 2003**), ou même après conservation de l'épididyme avec le testicule à 4°C pendant 0h , 24 h et 48 h (**Karja, 2010**).

James et al. (2002) ont stocké l'épididyme d'un étalon à 4°C pour 24, 48, 72 et 96 heures. Chez le taureau, le maintien de l'épididyme réfrigéré permet l'obtention de spermatozoïdes viables jusqu'à 72 heures après la mort (**Martins et al., 2009**). Selon **Belkadi et al., (2012)** un sperme épидидymaire recueilli à partir de la queue de l'épididyme d'un bélier peut être conservé à 4°C jusqu'à 72 h (**Belkadi et al., 2012**) et jusqu'à 12 jours (**Kaabi et al., 2003**). Le sperme épидидymaire d'un bélier récolté après 24h de conservation *in-situ* (dans l'épididyme non retiré du testicule) à 5°C préserve ses caractéristiques de fertilité (**Ouennes, 2012**).

L'objectif de notre projet est de contribuer à déterminer les particularités des espèces dans le domaine de récolte, d'analyse et de conservation du sperme épидидymaire ; et ce dans le but de l'utiliser à long terme. En effet, la cryoconservation nous permettra de réaliser la création d'une banque génétique des espèces menacées, ou celles présentant des qualités qu'il faut préserver. À cet égard, notre travail est divisé en quatre grandes parties.

➤ **Première partie** : Caractéristiques du sperme après abattage chez le coq fermier dans l'Est algérien. Le présent travail vise à étudier pour la première fois, les caractéristiques et la conservation du sperme post-mortem, obtenu à partir de 18 paires d'épididyme et de canal déférent de coqs adultes. Ce travail a fait l'objet d'une publication scientifique dont les références sont :

Ouennes H, Afri Bouzebda F, Bouzebda Z, Majdoub S, Djaout A and Adnane Smadi M (2019). The characterization of Post -Mortem Sperm of Local Chicken Cocks in Eastern Algeria. *J. World's Poult. Res.*, 9 (2) : 79-87.

➤ **Deuxième partie** : Effet de la température et du temps de conservation des testicules de bouc, sur la qualité du sperme épидидymaire : Première étape vers la cryobanque de populations locales algériennes. Cette étude permet d'évaluer la qualité en pré-congélation et en post-congélation du sperme épидидymaire du bouc local en fonction de la température de stockage des testicules et du temps écoulé entre la mort de l'animal et la récupération du sperme (0, 24, 48, 72 h), pour établir les protocoles optimaux de la cryoconservation du sperme épидидymaire dans cette espèce. Ce travail a fait l'objet d'une publication scientifique dont les références sont :

Ouennes H, Afri Bouzebda F, Bouzebda Z, Majdoub S, Djaout A and Adnane Smadi M (2019). Effect of testicle post-mortem storage on goat epididymal sperm quality: the first step towards cryobank for local Algeria breeds. *Revue Méd. Vét.*, 2019, 170, 7-9, 184-192.

➤ **Troisième partie** : Effets des antioxydants (Acide tannique, Trolox, Quercetin) sur la qualité du sperme épидидymaire cryoconservé chez la population locale bovine. La présente étude vise à trouver l'antioxydant le mieux adapté à la préservation du sperme épидидymaire, afin de créer une banque génétique de taureaux de population locale.

➤ **Quatrième partie** : Etat des lieux de la cryobanque à base de sperme épидидymaire pour les ressources génétiques animales en Algérie.

La dernière partie est la synthèse de la création de la banque de gène à base de sperme épидидymaire en Algérie.

Par ces travaux nous espérons apporter des renseignements fiables pouvant être considérés comme des outils permettant la réalisation d'une banque génétique à base de sperme épидидymaire. Nous terminerons notre travail par une discussion générale élaborée de tous nos résultats, et nous conclurons en apportant des recommandations qui seront nécessaires pour une contribution de la mise en place d'une cryobanque en vue de la préservation de la faune locale.

Premier volet

Caractérisation du sperme post-mortem chez le coq fermier dans l'Est de l'Algérie

Caractérisation du sperme post-mortem chez le coq fermier dans l'Est de l'Algérie.

Introduction

La conservation de la diversité génétique des animaux domestiques est un challenge pour la durabilité des ressources destinées à l'alimentation humaine, pour l'aménagement du territoire et plus largement pour le maintien de la biodiversité. Les ressources mondiales en volailles, principalement les poulets, constituent l'espèce aviaire la plus idéale et la plus dominante sur le plan économique, en particulier dans les zones rurales des pays en développement, car elles sont beaucoup plus faciles à gérer (Malvika *et al.*, 2019). Le poulet a été domestiqué il y a environ 8000 ans, mais ce n'est qu'à partir des années 1950 et la recherche de rythmes de croissance très élevés que les poulets d'élevage ont rapidement formé une nouvelle espèce morphologique (Rozières, 2018).

Les chercheurs ont ainsi analysé des données de poulets domestiques depuis 2000 ans et les ont comparées au coq doré, l'espèce sauvage. Une autre étude de 2014 avait ainsi montré l'évolution incroyable entre des poulets de 1957, 1977 et 2005. En 56 jours, un poulet atteignait en moyenne 900 grammes en 1957, contre 4,2 kg aujourd'hui (figure 5) (Rozières, 2018).

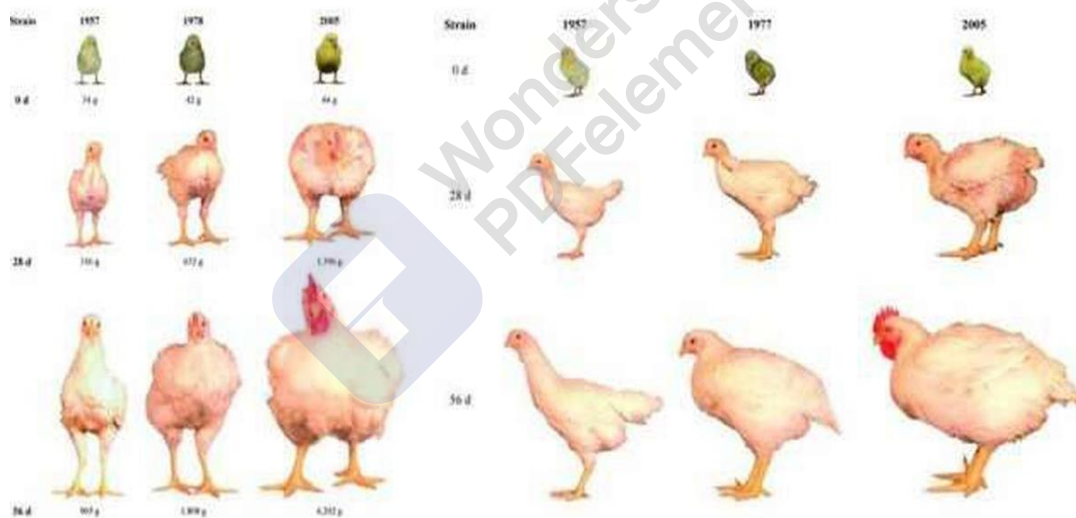


Figure 5. L'évolution de la poule à gauche en 1957, au milieu en 1978 et à droite en 2005 (Rozières, 2018)

Les caractéristiques du poulet ont radicalement évolué. En effet, cette espèce était beaucoup plus mince auparavant. Elle a ensuite été croisée avec des poulets à croissance rapide, car le blanc de poulet a été de plus en plus apprécié par les populations. Cela est dû à l'élevage intensif et l'industrialisation des poules. On observe souvent dans les élevages intensifs deux types de poules coexistant : les poules pondeuses et les poulets de chair, chez cette dernière, cette course à la croissance a des effets sur la santé et le bien-être des animaux, des pattes qui fléchissent sous le poids du corps, cela engendre des boiteries (<https://vivredemain.fr/2016/02/02/animaux-avant-domestication/>).

Les animaux souffrent aussi de troubles cardiaques avec des syndromes de mort subite (**Rozières, 2018**). De plus, l'ammoniac engendré par leurs déjections leur provoque de graves brûlures et abcès aux pattes et au bréchet (<http://www.gaia.be/fr/actualite/du-couvoir-labattoir-courte-vie-des-poulets-chair-est-enfe>).

Les animaux d'élevage intensif sont élevés dans des densités très élevées. On recense en poulet de chair environ 16-21 poulets par mètre carré (**Drèze, 2018**). Alors, en ce qui concerne les poules pondeuses, la majorité d'entre elles vit dans des élevages en cages de 750cm², alors que l'espace nécessaire à une poule pour étendre ses ailes est de 1876 cm² (**Drèze, 2018**). Ils ne peuvent pas exprimer les comportements normaux de leurs espèces. Ils sont en souffrance physique et psychique.

Et pour notre santé, ce type d'élevage a aussi des conséquences. Les animaux sont stressés et traités avec des médicaments (anti-inflammatoires, antibiotiques...) et tout cela se retrouve dans l'assiette des consommateurs. C'est-à-dire que les volailles devraient avoir accès à l'extérieur, être moins nombreuses et que les poules pondeuses ne devraient pas être maintenues en cage, mais avoir une grange à leur disposition pour pondre (**Drèze, 2018**). Cette densité très élevée, augmente forcément le risque de transmission des maladies parmi les animaux (**Cutler et al., 2010**). L'élevage intensif de poulets a des effets affirmés sur l'environnement, le bien être et la santé des volailles et surtout sur la santé publique, de plus son importance par le biais du non respect des normes de biosécurité conduit à l'apparition et la diffusion des épizooties.

Un groupe de travail des Nations Unies a déclaré que « les épidémies de grippe aviaire hautement pathogène (IAHP) sont généralement associées à une production intensive de volaille, au commerce et systèmes de commercialisation » (**Jones et al., 2013**). Cela offre des conditions idéales pour que les agents pathogènes se propagent rapidement, ainsi que davantage opportunités pour eux de muter en de nouvelles souches plus virulentes (**Jones et al., 2013**).

Or, la production de poulets est aussi émettrice de **gaz à effet de serre**. On estime que pour produire 1 kg de poulet, 7 kg de CO₂ sont émis ! C'est certes moins que pour l'élevage bovin, mais si l'on multiplie ce chiffre par le nombre d'animaux concernés, le résultat est loin d'être négligeable (**Puybasset, 2019**).

En 2009, la FAO a recensé 52 milliards de poules ou poulets hybrides sur la planète (**FAO, 2009**). Les races de poulets représentent la majorité (63 %) du nombre total de races aviaires dans le monde (**FAO, 2019**). **Ngou Ngoupayou et al. (1990)** et **Tchoumboue et al. (2000)** in **Bisimwa et al. (2019)**, indiquent que, les races indigènes représentent plus de 70% de la population de volailles mondiales ; alors qu'environ 40% des races aviaires ont un statut de risque inconnu. Actuellement, la population des poulets est de 22,7 Milliards de poulets domestiques "*Gallus Gallus Domesticus* » « contre environ 7,5 Milliards d'humains sur terre. Cela fait du poulet domestique un ordre de grandeur plus abondant que n'importe quel autre oiseau sur terre.

Ce phénomène est encore non admis par tous les scientifiques, mais il est en train de bien faire sa route. Le but recherché de tout cela est la sauvegarde de la planète qui va disparaître si on ne change pas de mode d'élevage surtout chez le poulet dont la population est la plus importante par l'action de l'homme dont le principal objectif est de produire beaucoup dans un cycle de plus en plus court (**Rozières, 2018**).

De ce fait, les poulets d'élevage sont un exemple potentiel de l'Anthropocène, c'est-à-dire l'ère géologique que nous vivons et qui se caractérise par notre empreinte sur la nature. Il faut donc changer notre mode de consommation pour changer le mode de production. Il faut encourager les élevages responsables et respectueux du bien-être animal. Beaucoup de pays reviennent vers l'élevage fermier ; familial ou carrément de basse-cour, avec les mentions de label et de bio. Et c'est à cette fin que la préservation des souches locales, indigènes, non sélectionnées et non croisées, doivent faire l'objet d'une sauvegarde urgente, non seulement pour contribuer à la sauvegarde de la biodiversité chez ces espèces, mais aussi dans un souci de préserver des souches dont les qualités d'adaptabilité à leur environnement sont très recherchées.

Dans les pays en développement, le logement, la gestion et l'alimentation des élevages de volailles indigènes dans les villages ruraux sont la plupart du temps élémentaires. Grâce à la sélection naturelle et à leur capacité de recherche de nourriture, les oiseaux sont capables de survivre, de grandir et de pondre dans ces environnements, et, ce faisant, d'apporter une contribution significative à la sécurité alimentaire et à l'apport en protéines des populations humaines. Cependant, la productivité généralement faible de ces géotypes signifie qu'il n'est pas rentable de les élever dans les systèmes de gestion intensive (FAO, 2021).

À l'heure actuelle, les races indigènes utilisées en élevage avicole familial dans les régions rurales des pays en développement apportent une contribution importante à la conservation mondiale des ressources génétiques de la volaille. Les ressources génétiques locales sont principalement représentées par la poule locale domestique (*Gallus gallus domesticus*). Le remplacement des races indigènes par des souches commerciales de volailles dans ces régions est préoccupant et pourrait poser une menace réelle pour les ressources génétiques avicoles (FAO, 2021).

Cette population locale avicole joue un rôle important dans l'économie tant rurale qu'urbaine, elle contribue significativement à la sécurité alimentaire, la lutte contre la pauvreté et à la gestion écologique des ressources naturelles (Ngou Ngoupayou *et al.*, 1990 ; Barua et Yoshimura, 1997 ; Gueye, 2003). Cette population peut offrir d'intéressantes options pour les produits commerciaux, en approvisionnement de produits de grande qualité et de grand intérêt pour les marchés locaux et régionaux (De Marchi *et al.*, 2005).

La production de volailles, viandes et œufs, obtenus de la race indigène, montre un caractère spécifique (De Marchi *et al.*, 2005 ; Castellini *et al.*, 2006 ; Zanetti *et al.*, 2011 ; Bisimwa *et al.*, 2019), qui les distinguent d'autres normes. Cependant, elle est aussi un moyen d'épargne, d'investissement et d'assurance pour les petits fermiers (Moula, 2012 ; Bisimwa *et al.*, 2019), une population peut être élevée à l'air libre. De plus ces races possèdent une immunité naturelle contre les maladies courantes et sont d'excellentes butineuses (Dessie *et al.*, 2011). L'une des caractéristiques les plus importantes des poulets indigènes est leur robustesse, c'est-à-dire leur capacité à supporter les conditions environnementales difficiles et les mauvaises pratiques d'élevage (climat, traitement, abreuvement et alimentation) sans perte importante de production (Dessie *et al.*, 2011 ; Padhi, 2016).

Toutefois elles restent malheureusement peu décrites dans la littérature et figurent parmi les ressources génétiques animales les plus menacées du monde et avec risque de perdre des caractères ignorés aujourd'hui, et potentiellement utiles demain (figure 6) (Fotsa, 2008 ; Moula *et al.*, 2009 ; Moula, 2012).

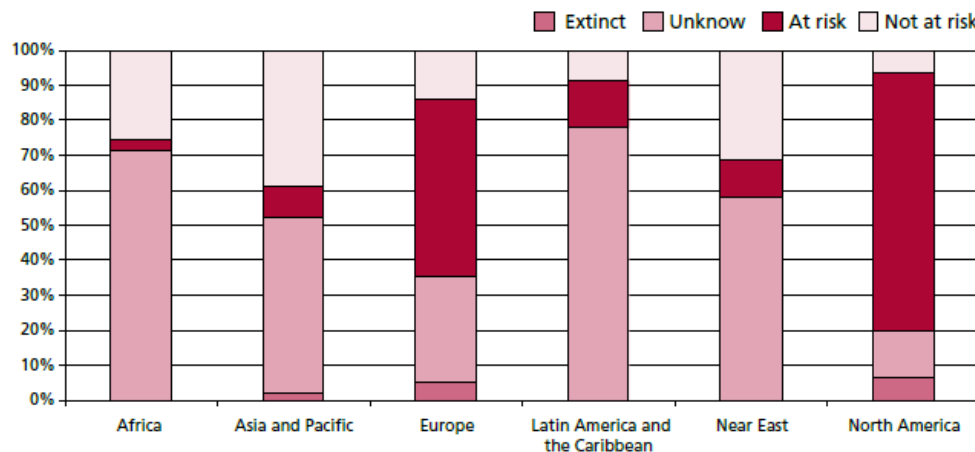


Figure 6. Statut de risque des races locales de poulets, par région (Pym, 2013).

Cependant, malgré son rôle important, le poulet local se trouve encore négligé par les programmes de conservation et d'amélioration d'autres espèces. Le maintien de la diversité génétique du bétail est considéré comme une condition préalable à la durabilité des systèmes de production animale (FAO, 2012 ; Leroy *et al.*, 2019). Les stratégies impliquent à la fois des techniques in situ et ex situ, ces dernières étant réparties entre ex situ-in vivo et la cryoconservation (c'est-à-dire ex situ in vitro), qui est définie comme la collecte et la congélation de sperme, des ovules, des embryons ou des tissus dans l'azote liquide en vue d'une éventuelle utilisation future pour la reproduction ou la régénération des animaux (Leroy *et al.*, 2019). Toutefois, ils se concentrent principalement sur la cryopréservation et les techniques de reproduction pour la conservation des ressources génétiques. La conservation in vitro du sperme des poules est une opération récente. Le sperme congelé des races locales est uniquement stocké dans quelques pays asiatiques et européens (FAO, 2006).

Des estimations fiables et appropriées sont nécessaires pour optimiser la gestion de la semence congelée. La qualité de cette dernière à l'état frais est mesurée par des paramètres morphologiques, métaboliques et des tests de motilité. Alors pour créer une banque de gènes à partir d'animaux morts, il faut renseigner sur le statut physiologique du donneur utilisé pour la reproduction (Kumar et Holt, 2014). Pour assurer une meilleure cryoconservation, il est indispensable d'évaluer la qualité et la quantité du sperme à l'état frais (Blesbois, 2007).

Cette étude a été menée dans l'objectif premier de la création d'une banque de matériel génétique à partir des mâles de poulets de la population indigène ; les étapes programmées à cet effet sont :

- Le choix de la méthode de collecte de la semence à partir de l'épididyme et du canal déférent,
- La caractérisation de la semence collectée,
- L'étude des moyens de sa conservation dans des conditions particulières de température et de durée.

I. Matériels et Méthodes

I.1 Site expérimental

Cette étude a été menée du mois de Septembre 2017 à Janvier 2019 au niveau du centre de Recherche en Biotechnologie « CRBt », qui a été créé par le décret exécutif N° 99-256 du 8 CHAABANE 1420 correspondant au 16 novembre 1999, modifié et complété par le Décret exécutif 07-338 du 19 CHAOUAL 1428 correspondant au 31 octobre 2007 portant création d'un Centre de Recherche en Biotechnologie.

Le CRBt est le premier centre national de biotechnologie placé sous la tutelle du Ministère de l'Enseignement supérieur et de la Recherche Scientifique, dont le siège est fixé à Constantine, chargé de la réalisation des programmes de recherche scientifique et du développement technologique dans les domaines des biotechnologies. Fonctionnel depuis mai 2010, le Centre a pour objectif principal « Le développement de la recherche notamment appliquée dans le domaine des biotechnologies en impliquant nos partenaires socio-économiques et pour la valorisation de nos ressources biologiques dans une démarche de développement durable » (figure7).



Figure 7. Site d'expérimentations (<https://www.crbt.dz>)

I.2 Matériels

I.2.1 Matériels biologiques

La présente étude visait à étudier pour la première fois les caractéristiques et la conservation des spermatozoïdes post-mortem, obtenues à partir de l'épididyme et des canaux déférents de 18 coqs adultes de la population locale, provenant de l'est de l'Algérie (El-Tarf et Constantine). Le choix des animaux est basé sur des caractères phénotypiques de chaque animal déterminé par une observation directe : morphologie, distribution, couleur du plumage ; couleur de la peau, du tarse et des oreillons ; type et taille de crête ; forme du squelette. L'âge des animaux est entre 12-24 mois, avec un poids corporel 1,50-2,53 kg (figure 8).



Figure 8. Variété de la population locale de l'espèce aviaire

I.2.2 Matériels non biologiques

I.2.2.1 Matériels d'euthanasie des coqs

Le matériel utilisé pour l'euthanasie des animaux est composé d'instruments métalliques faciles à désinfecter :

- Couteaux,
- Ciseaux fins et forts,
- Un sécateur pour l'ablation du bréchet (sectionner au niveau des articulations intercostales),
- Un bistouri composé d'un manche (ou porte-lame) et de lames stériles jetables,
- Un plateau en acier inoxydable,
- Une table et un appareil photographique numérique.

I.2.2.2 Matériels de prélèvement et d'étude du sperme

La récolte du sperme chez l'espèce avicole, et surtout après mortalité (abattage) nécessite un certain matériel, l'épididyme et le canal déférent ont été attachés avec des pinces puis isolés à l'aide des lames de bistouri. Le sperme a été récupéré dans des Eppendorf, des tubes secs de 2 ml ou dans des boîtes de pétrie, à partir du canal déférent et de l'épididyme selon la technique de prélèvement. L'incubation de l'échantillon a été effectuée dans une étuve, réglée à une température de 37 °C.

- Micropipettes (5 à 50 μ l), des pipettes (0,5 à 5 ml) et l'embout (jaune, blanc et bleu) (figure 9),
- Un microscope à platine chauffante « Nikon » E200-LED (figure 10),
- Spectrophotomètre « AccuRead » (figure 11),
- Étuve « Memmert » bactériologique 108 L (figure 12),



Figure 9. Pipette et micropipette



Figure 10. Un microscope à platine chauffante



Figure 11. Spectrophotomètre



Figure 12. Etuve

En outre ont été utilisés:

- Des colorants (éosine, nigrosine),
- Colorant Blue d'aniline (**®Blu anilina, Methylbleu, C.I42780, Biochem, Chemopharma,**
- D (+)-Glucose-monohydrate,
- Dimethyl sulfoxyde (DMSO),
- L'éthanol (95 %, 100%),
- De l'huile d'immersion,
- Du sérum physiologique,
- Des lames et des lamelles.

I.2.2.3 Matériels de conservation

Le matériel de conservation, consiste en : des micros tubes, des portoirs, un réfrigérateur réglé à 4 °C et des paillettes de 0.25ml.

I.3 Méthodes

I.3.1 Méthode d'extraction du canal déférent et de l'épididyme chez le coq

Le poids des animaux est mesuré à l'aide d'une balance électronique (figure 13), l'estimation de l'âge dépend des données fournies par le propriétaire et l'aspect de l'animal.



Figure 13. Détermination du poids chez le coq

I.3.1.1 L'euthanasie de l'animal

La scarification des animaux s'effectue par saignée, en incisant les veines jugulaires, les artères carotides et la trachée avec un couteau. Après l'euthanasie par dislocation cervicale des coqs, le prélèvement des testicules et les canaux déférents a été opéré dans l'heure qui a suivi la mise à mort, et ce par une incision réalisée sur la longueur de la ligne médiane de l'animal en décubitus dorsal (Crespeau, 1992 ; Savoyet ,2018) (figure14).

I.3.1.2 Ouverture de la cavité thoraco-abdominale

Inciser les muscles abdominaux latéralement au-dessus de l'os pubien et jusqu'à l'articulation de la portion sternale et vertébrale de la dernière côte.

- Inciser les muscles pectoraux suivant une ligne qui suit les articulations costo-costales.
- Sectionner les côtes au niveau du cartilage articulaire.
- Sectionner les os coracoïdes puis les clavicules en leur milieu.
- Soulever le plastron abdomino-sternal (Crespeau, 1992 ; Savoyet ,2018).

I.3.1.3 Éviscération

Tous les viscères ont été retirés ensemble avec l'uretère et le système vasculaire rénal pour éviter d'endommager le canal déférent (figure 15). L'uretère et le système vasculaire rénal ont été soigneusement disséqués afin de minimiser la contamination d'échantillon de sperme par le sang et l'urine (Crespeau, 1992 ; Savoyet, 2018).

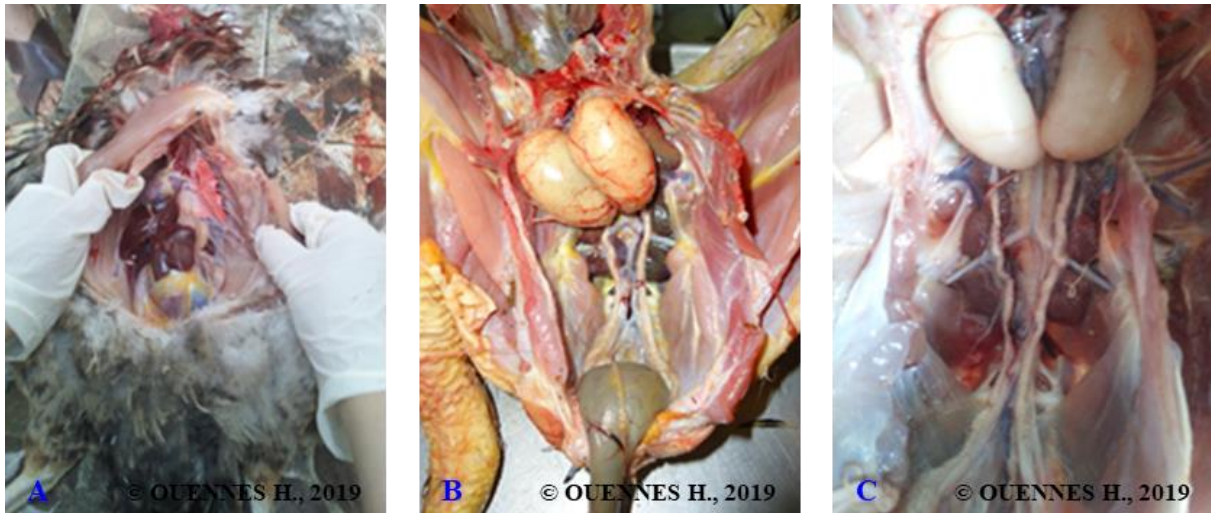


Figure 14. L'ouverture de la carcasse du coq adulte ; A : Incision des muscles abdominaux, B.C. Extraction des organes génitaux.

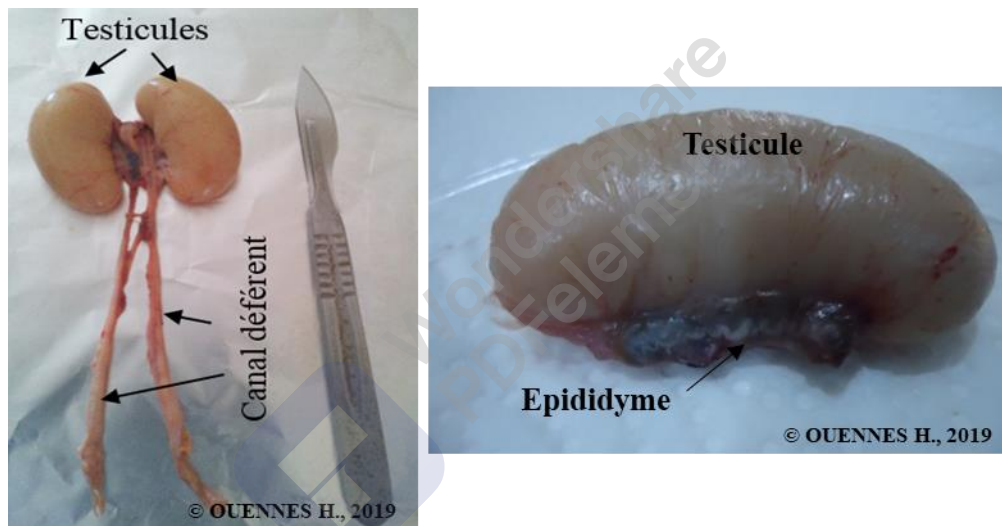


Figure 15. Appareil génital mâle d'un coq adulte.

Une fois que l'épididyme et le canal déférent ont été isolés des testicules et des tissus adjacents, la collecte du sperme a été effectuée par les différentes méthodes de récolte du sperme après abattage décrite dans la partie méthodologie. La semence collectée a fait l'objet d'un examen macroscopique et microscopique en vue de la détermination de la qualité des spermatozoïdes récoltes.

I.3.2 Méthodes de récolte du sperme

Plusieurs méthodes de récolte du sperme (post-mortem) peuvent être utilisées par exemple, la macération, le flushing (rinçage), l'incision (flot-up) après la mort des animaux (Khalil Rezk, 2009) ; ces dernières diffèrent selon les espèces animales (Julienne Posière, 2002 ; Guérin *et al.*, 2003 ; Martinez Pastor *et al.*, 2006 ; Rizal, 2009), et surtout leurs tailles (Martinez Pastor *et al.*, 2006).

I.3.2.1 Méthode de Hachage (Mincing)

La technique de Hachage consiste à isoler l'épididyme du testicule, haché à l'aide de ciseaux chirurgicaux stériles placés dans des microtubes contenant 1 ml de solution saline tamponnée au phosphate (PBS), puis on laisse reposer pendant 10-15 minutes. La partie liquide supérieure a été transférée dans un autre tube de micro-centrifugation pour une évaluation microscopique (Salting *et al.*, 2016).

I.3.2.2 Méthode de flusching ou rinçage

Les échantillons ont été obtenus par l'injection de 1,5 ml de solution saline à 38 °C dans la partie proximale du canal déférent à l'aide d'une aiguille 27 g fixée à une seringue de 5 ml (figure 16). Le volume total de la solution saline et le sperme collecté ont été placés dans une boîte de Pétri en matière plastique stérile, à partir de laquelle elles ont été transférées dans un tube en polystyrène (2 ml). Les échantillons ont ensuite été incubés à 38 °C pendant 15 min (Villaverde-Morcillo, 2016). Le surnageant est éliminé et le culot analysé.

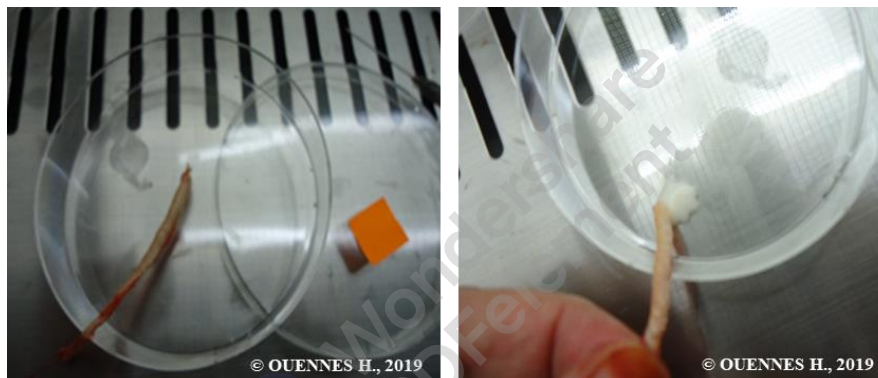


Figure 16. Extraction du sperme de canal déférent après l'abattage du coq par rinçage.

I.3.2.3 Méthode Flot-up

Le canal déférent a été découpé en morceaux de 0,5 cm de long, puis immergés dans 1,5 ml de solution saline à 38 °C dans un tube de 2 ml. Ces échantillons ont ensuite été incubés à 38 °C pendant 15 min (Villaverde-Morcillo, 2016). La partie liquide a été transférée dans un microtube pour une appréciation microscopique.

I.3.3 Méthodes d'appréciation de la qualité spermatique

I.3.3.1 Détermination du volume spermatique

Le volume de sperme (ml) a été mesuré à l'aide d'un tube gradué (microtube de 1,5 ml). Le volume total récupéré après hachage ou flot-up a été considéré comme le volume de sperme final pour calculer la concentration.

I.3.3.2 Détermination de la concentration

La concentration en spermatozoïdes est définie comme le nombre de cellules par ml. L'objectif de cette mesure est de pouvoir déterminer le nombre des 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.

La concentration de spermatozoïdes (*millions par millilitre*) a été déterminée en utilisant un spectrophotomètre calibré, spécifique aux volailles. La longueur d'onde est fixée à 650 nm. L'absorbance convertie en concentration de sperme, est obtenue suite à la lecture au spectrophotomètre, d'une cuve dans laquelle on dépose 15 μ l de sperme, additionné avec 3ml d'une solution de citrate de sodium à 2,9 % (pH 7,0) (Salisbury *et al.*, 1978).

I.3.3.3 Évaluation de la mobilité des spermatozoïdes

La motilité est une évaluation des mouvements des spermatozoïdes. Selon Gadea, (2005) in David (2008), ces mouvements traduisent le fait que la membrane des spermatozoïdes est intacte et fonctionnelle ce qui sous-entend que le sperme est fécondant. La plus utilisée en routine est l'évaluation subjective de la motilité massale (David, 2008).

C'est une mesure rapide et facile qui nécessite un examen microscopique, une goutte de sperme (10 μ l) a été placée sur une lame de microscope propre et préchauffée (41 °C) à l'aide d'une micropipette. Une lamelle de couverture propre a été placée doucement pour éviter la formation de bulles d'air, sous un grossissement X10 (figure 17). La motilité des spermatozoïdes a été démontrée et appréciée par le mouvement ondulatoire progressif des spermatozoïdes sous un microscope à contraste de phase (Beltran, 2011 ; Salting *et al.*, 2016 ; El-Seadawy *et al.*, 2017). L'observation doit être faite très rapidement car la motilité massale du sperme pur à cette température diminue rapidement au bout de 15 à 20 secondes.

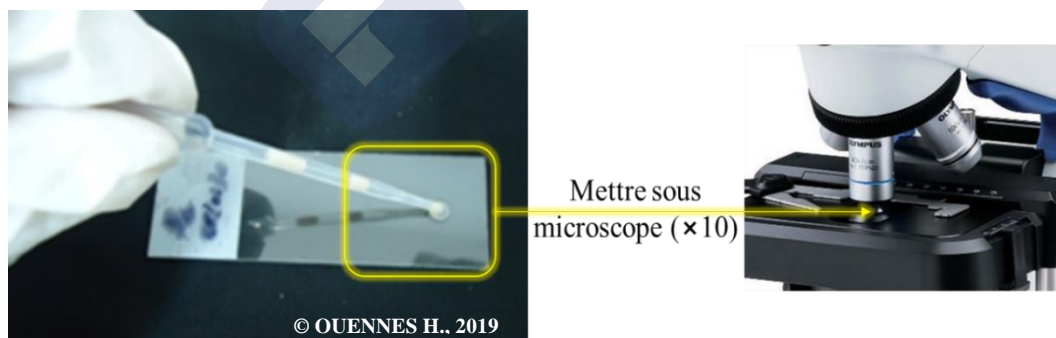


Figure 17. Méthode d'appréciation de la motilité Massale

Le système de notation a été utilisé pour l'évaluation du mouvement des spermatozoïdes afin d'évaluer la motilité des spermatozoïdes (Mamuad *et al.*, 2004 ; Salting *et al.*, 2016). La mesure faite en utilisant une échelle de notes subjectives allant de 0 à 5 (tableau 5) (Dumasy *et al.*, 2011).

Tableau 5. Détermination de la note de motilité massale de la semence (Konfe, 2014)

Note	Pourcentage approximatif (%)	Nature du mouvement
0	0	Aucun mouvement en surface
1	20	Léger mouvement à la surface
2	40	Mouvement net, mais ne formant pas de vagues
3	60	Début de vagues
4	80	Vagues très nettes
5	100	Tourbillons nettement visibles

I.3.3.4 Mesure du pourcentage des spermatozoïdes vivants/morts (nécrospermie)

Ce test est efficace pour déterminer le pourcentage exact de spermatozoïdes vivants/morts et aussi la morphologie, qui utilise un colorant d'éosine-nigrosine. La solution *éosine-nigrosine* est préparée selon le protocole décrit par **Amadou Souley (2013)** : * 1 g d'éosine + 2g de Nigrosine + 3,57 g de tri-citrate de sodium + 100 ml d'eau distillée. Ce mélange est laissé au repos pendant 24 h à +4 °C, puis filtré par la suite. En fin, le pH de la solution est ajusté à 6,7 - 6,8 avec la solution d'acide citrique concentrée.

I.3.3.4.1 Coloration de la semence et préparation des lames

On utilise une lame correctement nettoyée, sur la partie gauche de la lame, on dépose 20µl de colorant.

1. On ajoute une goutte de sperme dilué (20 µl) (la dilution de la semence pour une observation correcte doit être comprise entre 60x10⁶ et 200x10⁶ spz/ml) ; et on mélange avec le colorant pendant 10 secondes (figure 18).
2. On laisse reposer le mélange pendant 50 secondes. Puis, on étale le mélange « colorant- semence » à l'aide d'une lamelle en un film aussi fin et régulier que possible (figure 19).
3. On identifie la lame avec le numéro du coq (figure 20), on conserve la préparation à sec dans une enceinte sèche (plaque chauffante réglée à 37 °C) (figure 21) ou dans une boîte à lame en plastique fermée et étanche (elle-même placée dans un sac en plastique scellé).
4. Dans ces conditions, la préparation peut être conservée durant plusieurs mois sans altération (**Baril et al., 1993**).

Les spermatozoïdes, dont la membrane est endommagée (morts) se laissent pénétrer par le colorant et apparaissent, en totalité ou en partie, en roses ou en rouge (éosine) sur le fond blanc (nigrosine) alors que les spermatozoïdes vivants ayant une membrane intacte apparaissent incolores (**Belkhiri, 2019**).

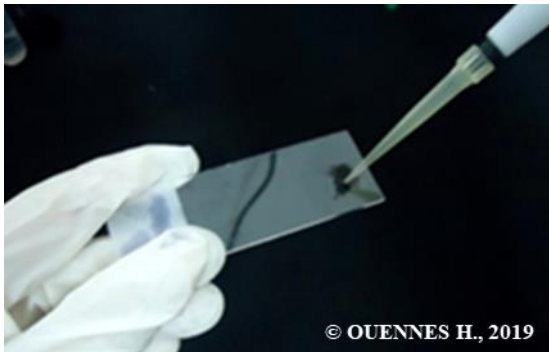


Figure 18. Mélange de la goutte du sperme avec colorant (éosine nigrosine).



Figure 19. Étalement du frottis de semence.

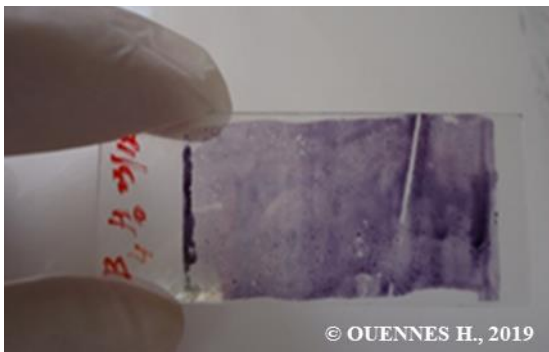


Figure 20. Frottis de semence.



Figure 21. Séchage les lames sur une plaque chauffante.

I.3.3.4.2 Méthode de comptage des différentes classes de spermatozoïdes

Après préparation, la lame est mise sous microscope au grossissement X100 immergé dans une goutte d'huile à immersion. La lame est déplacée de gauche à droite et de haut en bas pour visualiser l'ensemble des champs de la lame. Au moins 200 spermatozoïdes sont comptés avant de déterminer le pourcentage de viabilité (Gaelle et Douet, 2000 ; Benhenia *et al.*, 2018 ; Belkhiri, 2019).

I.3.3.5 Mesure du pourcentage de spermatozoïdes anormaux (téatospermie)

L'examen morphologique des spermatozoïdes, consiste en l'observation au microscope optique d'un étalement de semence coloré à l'éosine-nigrosine. Le frottis est coloré de la même manière que pour l'examen de la vitalité ; sous microscope à contraste de phase et sous immersion, les anomalies sont comptées sur au moins 200 spermatozoïdes (Belkhiri, 2019). La classification est basée sur la répercussion des formes anormales des spermatozoïdes sur la fertilité (Figure 22) (Rege *et al.*, 2000).

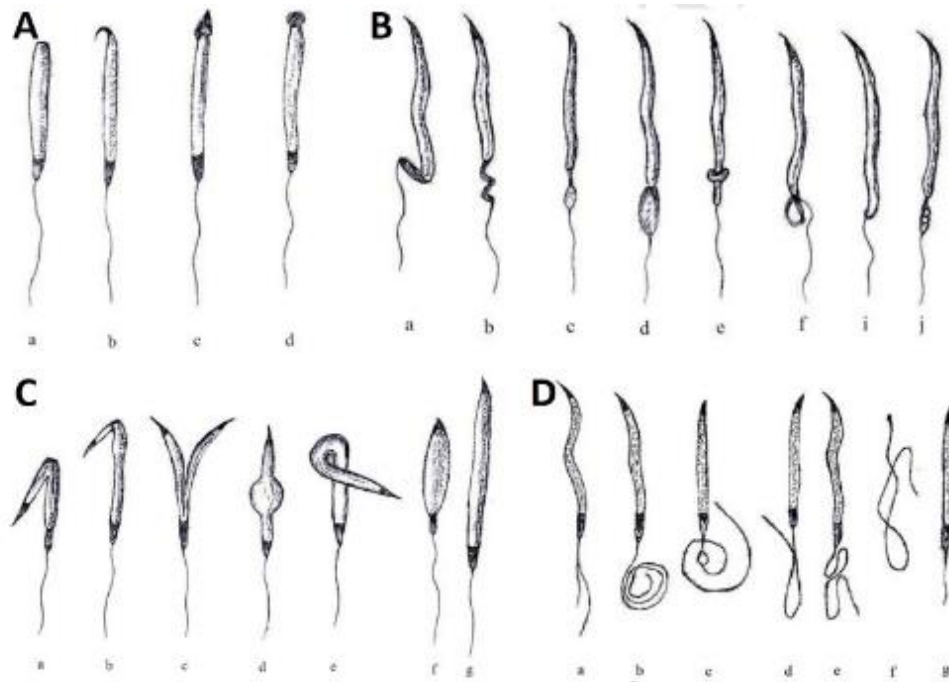


Figure 22. Représentation schématique des anomalies morphologiques de spermatozoïdes

Les anomalies des spermatozoïdes présentées sur la figure 22 sont comme suit :

- **A**, présentant des défauts d'acrosome (a) sans acrosome, (b) acrosome en forme de crochet, (c) gonflement de l'acrosome et (d) acrosome arrondi ;
- **B**, présentant des défauts au niveau de la pièce médiane (a) pièce médiane courbée, (b) pièce médiane irrégulière, (c) pièce médiane partiellement détachée, (d) pièce médiane gonflée, (e) pièce médiane gonflée près de la région du cou, (f) pièce médiane nouée, (i) sans pièce médiane et (j) pièce médiane spiralée ;
- **C**, présentant des défauts de tête (a) tête courbée, (b) tête en forme de crochet, (c) tête double, (d) tête gonflée, (e) tête nouée, (f) tête courte et (g) tête plus grosse ;
- **D**, présentant des défauts de queue (a) queue double, (b) queue enroulée, (c) queue nouée, (d) queue courbée, (e) queue enroulée, (f) queue détachée et (g) queue courte (**Baboo et al., 2018**).

I.3.3.6 Évaluation de l'intégrité acrosomiale

L'intégrité de l'acrosome a été évaluée par la coloration **Giemsa** (colorer l'acrosome en violet foncé). La technique de coloration était la suivante :

1. Le sperme dilué a été étalé et séché à l'air.
2. Le frottis a été fixé dans une solution saline neutre à 10 % pendant 15 min.
3. Le frottis fixé a été lavé à l'eau courante pendant 20 minutes.
4. Le frottis fixé a été immergé dans la solution Giemsa pendant la nuit.
5. Le frottis coloré a été rincé deux fois avec l'eau distillée et séché à l'air. Cent (100) spermatozoïdes par échantillon ont été examinés avec une immersion dans l'huile à un grossissement de X100 pour vérifier l'intégrité des acrosomes dans chaque frottis coloré (**El-Seadawy et al., 2017**).

I.3.3.7 Évaluation de la condensation de la chromatine

La coloration en bleu d'aniline permet de définir le degré de condensation de la chromatine du noyau spermatique, et par conséquent le niveau de maturité nucléaire spermatique. En effet, l'ADN spermatique contient des histones qui sont progressivement remplacées par des protamines au cours de la maturation spermatique, permettant ainsi la forte compaction de l'ADN (**Shanmugam et al., 2016**).

6. Une goutte de sperme est étalée sur une lame, séchée à l'air libre.
7. Les lames à analyser sont fixées à l'éthanol 95 % pendant 5 minutes, immergées pendant 5 min dans une solution (bleu d'aniline acétifiée à 5 %), préparées extemporanément (dissolution de 1 g de bleu d'aniline dans 0,8 ml d'acide acétique, ajustement du volume avec de l'eau distillée jusqu'à 20 ml et filtration de la solution obtenue).
8. Les lames sont rincées dans l'eau distillée (3x1minute), déshydratées par immersion successive dans une solution d'éthanol de densité croissante (éthanol à 95 % 3 minutes ; éthanol 100 % 3 minutes) et enfin séchées à l'air.
9. Au microscope optique, au grossissement x100 (immergée dans l'huile), 200 spermatozoïdes ont été examinés avec un balayage de la lame (gauche à droite et du bas au haut) (**Boitrelle, 2014**).

Les noyaux spermatiques contenant beaucoup d'histones sont colorés en bleu foncé. Quand toute la tête du spermatozoïde est bleu foncé, la chromatine est dite totalement mal condensée (due à l'excès d'histone). Quand 20 à 50% de la tête est colorée en bleu foncé, la chromatine est dite partiellement non condensée (figure 24). Les noyaux spermatiques contenant moins de 15-20% d'histones sont non colorés et apparaissent bleu pâle (**Sellami et al., 2013 ; Boitrelle, 2014 ; Al-Ebrahimi et Al-Sultani, 2015 ; Berby, 2017**).

I.3.4 Méthode de conservation

Le canal déférent est conservé dans un tube sec de 2 ml (porté dans un portoir) pendant 2 h, 24 h à 20°C (ambiante) et 24 heures à 4 °C (réfrigération) dès que possible après son extraction. La date et l'heure de l'euthanasie, de la collecte des organes génitaux et de réfrigération sont notés et jointes à l'échantillon correspondant.

I.3.5 La cryoconservation du sperme chez le coq

Après la récolte, le sperme subi des traitements relatifs à la dilution et à la congélation dans le but d'assurer une conservation durable et fécondante.

I.3.5.1 La Dilution

Le rôle de dilueurs est de préserver la mobilité des spermatozoïdes, de protéger leur caractère fécondant, de tamponner le milieu, d'apporter les nutriments essentiellement énergétiques et de les préparer à la congélation. Ainsi, les différents diluants sont caractérisés par leur système tampon (citrate, phosphate, acétate) et chélatant (glycine, glutamate) et comprennent généralement un sucre (glucose, fructose). Parmi les composantes de la dilution on trouve : L'acide citrique, l'acétate Mg, le citrate K3, le citrate Na-2H₂O, le glutamate de sodium, l'acétate Na, le chlorure de magnésium, le glucose, le fructose, le NaOH, blanc d'œuf, lait écrémé et l'eau distillée. Suite à la non-disponibilité de la plupart des produits suscités ; on a choisi de diluer la semence de coq récolté dans notre expérimentation selon la méthode de **Kuzlu et Taski, (2017)** et dont la composition est reportée au tableau 6. Le taux d'osmolarité est de 370 mOsm/l et le pH 7.8 (**Kuzlu et Taski, 2017**).

Tableau 6. Composition du diluant (Kuzlu et Taski, 2017).

Produit	Quantité
<i>D(+)-Glucose-monohydrate</i>	0,37g
<i>Dimethyl sulfoxyde (DMSO)</i>	%5(v/v)
<i>L'eau distillée</i>	100ml

I.3.5.2 Le taux de dilution

Une dilution trop forte du sperme provoque une diminution de la mobilité et de la fécondité des spermatozoïdes. Pour les différentes espèces avicoles, le taux de dilution optimum de dilution se situe entre 1/3 et 1/2. Le taux de dilution utilisé est de 1 volume de sperme avec 3 volumes de dilueurs avec une concentration de 100×10^6 spz/ml par paillette (**Akcay et al., 2006; Kuzlu et Taski, 2017**). La préparation des échantillons de sperme de coq à la congélation à lieu à une température voisine de 4 °C pendant 90 minutes (étape d'équilibration) (**Kuzlu et Taski, 2017**) ; suivie par la congélation proprement dite dans des vapeurs d'azote après une étape de calibration de cinq minutes (**Kuzlu et Taski, 2017**). Le sperme étant conditionné en paillettes de 0.25 ml.

I.3.6 Études statistiques

Les données ont été analysées à l'aide du logiciel SPSS (version 19). L'appréciation de la qualité du sperme au niveau de l'épididyme et le canal déférent, la comparaison entre deux techniques de récolte (flot-up et rinçage), l'effet de la durée et de la température de conservation du canal déférent (2 h, 24 h à 20°C et 24 heures à 4°C) sur la qualité du sperme ont été comparés par le test ANOVA suivie du test de comparaison multiple de Student Newman-Keuls. Les valeurs moyennes ont été considérées de manière significative à $p < 0,05$, les données sont exprimées en moyenne \pm écart-type.

II. Résultats

II.1 Étude de la qualité du sperme post-mortem prélevé au niveau de l'épididyme et du canal déférent

Les résultats de l'analyse descriptive de la qualité du sperme post-mortem prélevé au niveau de l'épididyme et du canal déférent (le volume, la motilité massale, la concentration, la viabilité, le pourcentage des spermatozoïdes anormaux et la qualité de la chromatine) sont présentés dans les tableaux 7 et 8.

Tableau 7. Analyse descriptive de la qualité du sperme récolté au niveau de l'épididyme et le canal déférent de coqs fermiers dans l'Est Algérie ($\bar{X} \pm SEM$).

	Moy	Éc-type	Err std	Var	Min	Max
Vol (ml)	0,42	0,32	0,09	0,10	0,10	0,80
Conc (*10⁶)	2791,67	2937,98	848,12	8 631 742,42	100,00	7000,00
MM (%)	73,33	9,85	2,84	96,97	60,00	90,00
Viabilité (%)	69,83	18,55	5,35	343,97	40,00	90,00
Spz anormal (%)	20,92	9,34	2,70	87,17	12,00	38,00
Qualité de la chromatine (%)	77,17	5,59	1,61	31,24	65,00	82,00

Vol : Volume spermatique, Conc : Concentration, MM : Motilité massale, Spz : Spermatozoïdes.

Tableau 8. Comparaison de la qualité du sperme récolté au niveau de l'épididyme et du canal déférent de coqs fermiers dans l'Est Algérie ($\bar{X} \pm SEM$).

	Épididyme	Canal déférent	<i>p</i>
N	12	12	
Vol (ml)	0,13± 0,05	0,72 ± 0,12	***
Conc (*10⁶)	250 ± 137,84	5333,33 ± 1861,90	***
MM (%)	65,83 ± 4,92	80,83 ± 7,36	**
Viabilité (%)	53,17 ± 9,13	86,50 ± 2,59	***
Spz anormaux (%)	21,17 ± 3,37	20,67 ± 13,43	ns
Qualité de la chromatine (%)	78,17 ± 4,75	76,17 ± 6,62	ns

N : Nombre, *Vol* : Volume spermatique, *Conc* : Concentration, *MM* : Motilité massale, *Spz* : Spermatozoïdes, *ns* : Aucune différence significative, ** $P < 0,01$ et *** $P < 0,001$

II.1.1 Le volume spermatique

Le volume spermatique récolté était significativement ($p < 0,05$) influencé par le niveau de récolte. Le volume spermatique est significativement plus élevé ($p < 0,001$) dans le canal déférent avec une valeur moyenne de $0,72 \pm 0,12$ ml (tableau 8) par rapport au canal épидидymaire ($0,13 \pm 0,05$ ml).

II.1.2 La concentration de sperme en spermatozoïdes

La valeur moyenne de la concentration de sperme en spermatozoïdes récolté au niveau du canal déférent est significativement plus élevée ($p < 0,001$) que celle collectée du canal épидидymaire, avec des valeurs moyennes de $5333,33 \pm 1861,90 \times 10^6$ spz/ml et $250 \pm 137,84 \times 10^6$ spz/ml (tableau 8) respectivement.

II.1.3 La motilité massale

La motilité massale (MM), rapportée en pourcentage, varie entre $80,83 \pm 7,36\%$ et $65,83 \pm 4,92\%$ respectivement sur le sperme récolté à partir du canal déférent et de l'épididyme (tableau 8). D'après ces résultats, nous avons constaté que la motilité massale a subi une variation significative ($p < 0,01$).

II.1.4 Le pourcentage des spermatozoïdes vivants

Le pourcentage des spermatozoïdes vivants récolté du canal déférent est significativement ($p < 0,001$) plus élevé que celui de l'épididyme ($86,50 \pm 2,59\%$ vs $53,17 \pm 9,13\%$).

II.1.5 Le pourcentage des spermatozoïdes anormaux

Le taux des spermatozoïdes anormaux ne diffère pas ($p > 0,05$) quel que soit la zone de récolte (figure 23), nous avons noté un pourcentage de spermatozoïdes anormaux de $21,17 \pm 3,37\%$ récolté de l'épididyme et un taux de $20,67 \pm 13,43\%$ récupéré du canal déférent.

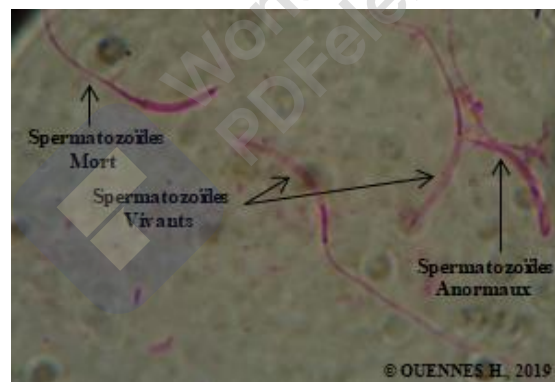


Figure 23. Appréciation des spermatozoïdes vivants et anormaux

II.1.6 La condensation de la chromatine

La valeur de la qualité de la chromatine des spermatozoïdes, récoltés du canal déférent et de l'épididyme n'a révélé aucune différence significative ($p > 0,05$) (tableau 8), malgré que le pourcentage des spermatozoïdes avec une bonne qualité de la chromatine est de $78,17 \pm 4,75\%$ pour les spermatozoïdes de l'épididyme. Alors que celui des spermatozoïdes du canal déférent est de $76,17 \pm 6,62\%$.

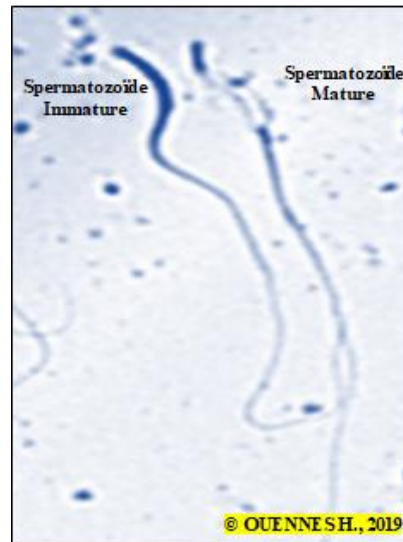


Figure 24. Coloration des spermatozoïdes avec bleue d'aniline (la condensation de la chromatine).

II.2 Étude comparative entre deux méthodes de récolte du sperme post-mortem chez le coq adulte

Cette étude est une comparaison entre deux techniques de récolte de sperme post-mortem : la méthode de rinçage (rétrograde) et la méthode de flot-up, au niveau du canal déférent chez le coq de population locale de l'Est algérien. Les résultats concernant le volume spermatique, la motilité massale, la viabilité, la concentration et le pourcentage des spermatozoïdes anormaux ; et leurs variations sont reportées au tableau 9 et 10.

Tableau 9. Analyse de comparaison entre deux méthodes de récolte du sperme flot-up (flottaison) et rétrograde (rinçage) chez le coq fermier.

	Moyenne	Écart-type	Erreur std	Variance	Min	Max
Vol (ml)	0,44	0,30	0,09	0,09	0,10	0,80
Conc (*10⁶)	2,54	1,47	0,42	2,16	1,00	5,00
MM (%)	76,67	7,49	2,16	56,06	65,00	85,00
Viabilité (%)	74,83	9,80	2,83	95,97	60,00	88,00
Spz anormaux (%)	30,33	4,46	1,29	19,88	24,00	37,00

Vol : Volume spermatique, Conc : Concentration, MM : Motilité massale, Spz : Spermatozoïdes

Tableau 10. Comparaison de la qualité spermatique post-mortem, selon la technique de récolte chez le coq fermier ($\bar{X} \pm SEM$).

	Technique flot-up	Technique rétrograde	<i>p</i>
N	6	6	
Vol (ml)	0,17±0,08	0,72±0,12	***
Conc (*10⁶)	1,75±0,76	3,33±1,63	<i>Ns</i>
MM (%)	75,83±8,61	77,50±6,89	<i>Ns</i>
Viabilité (%)	74,67±10,15	75,00±10,39	<i>Ns</i>
Spz anormaux (%)	30,33±4,68	30,33±4,68	<i>Ns</i>

N : Nombre, *Vol* : Volume spermatique, *Conc* : Concentration, *MM* : Motilité massale, *Spz* : Spermatozoïdes, *** $p < 0,001$, *ns* : pas de différence significative

II.2.1 Volume spermatique

Une différence hautement significative ($p < 0,001$) a été observée entre la valeur moyenne du volume spermatique récolté chez le même coq (tableau 10) par les méthodes rétrograde et flot-up, avec des valeurs respectives (0,72±0,12 ml vs 0,17±0,08 ml).

II.2.2 Concentration de sperme

La moyenne de la concentration de sperme récolté par la technique rétrograde montre une valeur relativement élevée (3,33±1,63x10⁶spz/ml) (tableau 10) à celle utilisant la technique par flot-up (1,75±0,76x10⁶ spz/ml). Les différences observées entre les deux méthodes de récolte ne sont pas statistiquement significatives ($p > 0,05$).

II.2.3 Motilité massale

La valeur moyenne de la motilité massale des spermatozoïdes récoltés par la méthode rétrograde 77,50± 6,89% est supérieure à celle des spermatozoïdes récoltés par la méthode dite flop-up 75,83± 8,61% (tableau 10), mais sans différence significative ($p > 0,05$).

II.2.4 Pourcentage de spermatozoïdes vivants

Le pourcentage de spermatozoïdes vivants récolté par la méthode flot-up ou rétrograde (74,67± 10,15% vs 75,00± 10,39%), ne présente aucune différence significative ($p > 0,05$).

II.2.5 Pourcentage de spermatozoïdes anormaux (tératospermie)

Le tableau 9 fait ressortir les mêmes valeurs moyennes du pourcentage des spermatozoïdes anormaux (30,33± 4,68%) quelle que soit la méthode de récolte (flot-up ou rinçage), aucune différence significative ($p > 0,05$) n'a été observée.

II.3 Effet de la température sur la qualité du sperme post-mortem

Les résultats de l'effet de la température sur la qualité du sperme durant la conservation in situ, 2h et 24 h à 20°C, après abattage sont visibles aux tableaux 11 et 12. Dans cette étude, les échantillons de sperme obtenus du canal déférent des coqs locaux, conservés 24h à 4 °C, après abattage sont aussi déterminés. Les moyennes, les écarts-types, les minima, les maxima et coefficients de variation des valeurs moyennes de la motilité massale, la viabilité, le pourcentage des spermatozoïdes anormaux et l'intégrité acrosomiale sont présentés dans le tableau 11.

Tableau 11. Analyse de la conservation du canal déférent à différentes températures et temps (2h et 24h à 20 °C, et 24h à 4 °C) chez le coq fermier.

Critères mesurés	Moy	Écart type	Erreur std	Var	Min	Max
MM (%)	75,00	12,74	3,68	162,36	50,00	89,00
Viabilité (%)	70,08	15,66	4,52	245,36	45,00	89,00
Spz anormaux (%)	31,42	3,94	1,14	15,54	27,00	37,00
Intégrité de l'acrosome (%)	77,08	8,38	2,42	70,27	60,00	89,00

MM : Motilité massale, Spz : Spermatozoïdes

Tableau 12. Effets de la conservation du canal déférent à différentes températures de coqs autochtones dans l'Est Algérie ($\bar{X} \pm SEM$).

Critères mesurés	2h	24h 4 °C	24h 20 °C	P
N	6	3	3	
MM (%)	81,00±2,19	55,00±5,00	83,00±7,21	***
Viabilité (%)	75,50±11,11	48,33±3,51	81,00±7,21	**
Spz anormaux (%)	32,00±4,65	32,00±4,36	29,67±2,52	ns
Intégrité de l'acrosome (%)	75,67±10,61	75,33±2,52	81,67±7,51	ns

N : Nombre, MM : Motilité massale, Spz : Spermatozoïdes, h : heures, ** $p < 0,01$ et *** $p < 0,001$, ns : pas de différence significative.

II.3.1 Motilité massale

La motilité massale des spermatozoïdes recueillis à partir du canal déférent conservé pendant 24h à deux différentes températures, 4°C et 20°C est de 55±5% et 83±7,21% respectivement, une différence hautement significative ($p < 0,001$) a été observée entre la motilité des spermatozoïdes conservés pendant 24h à 4°C et à 20°C, alors qu'aucune différence n'a été observée entre la motilité des spermatozoïdes récoltés 2 h après abattage et après conservation du canal déférent pendant 24 h à 20°C (81,00±2,19% vs 83,00±7,21%).

II.3.2 Pourcentage de spermatozoïdes vivants

Une différence significative ($p < 0,01$) est relevée dans la variabilité du pourcentage des spermatozoïdes récoltés du canal déférent conservés à 4 °C et à 20 °C pendant 24h, et dont les valeurs respectives sont de 48,33±3,51% et 81±7,21%.

II.3.3 Le pourcentage des spermatozoïdes anormaux et l'intégrité acrosomiale

Aux deux températures testées 4°C et 20°C, l'analyse statistique a révélé respectivement un pourcentage moyen des spermatozoïdes anormaux de $32 \pm 4,36\%$ et $29,67 \pm 2,52\%$, et un pourcentage des spermatozoïdes avec un acrosome intact de $75,33 \pm 2,52\%$, et $81,67 \pm 7,51\%$. Toutefois, aucune différence significative n'est observée pour les deux facteurs étudiés (le taux de tératospermie et l'intégrité de l'acrosome).



III. Discussion

III.1 Étude de la qualité du sperme post-mortem prélevé au niveau de l'épididyme et du canal déférent

La reproduction chez l'espèce aviaire représente un processus très spécifique (**Blesbois, et Brillard, 2007 ; Blesbois, 2018**). Ce sont des espèces ovipares avec des gonades internes, et la gamétogenèse se déroule à une température corporelle élevée (40–42°C) (**Santiago-Moreno et Blesbois, 2020**).

Il est important de connaître et de saisir l'importance des changements morphologiques des spermatozoïdes au cours de son passage dans le tractus génital, pour bien comprendre le mécanisme de fertilisation et de la capacitation des spermatozoïdes.

Plusieurs travaux ont été rapportés chez différentes races de volaille dans le monde (**Birketf Howarth, 1983 ; Bath et Chaudhari, 2002 ; González-Santos et al., 2019**).

Par contre, aucun travail n'a été effectué sur la qualité du sperme récolté après abattage chez le coq de la population locale algérienne.

Un rappel sur la structure anatomique de l'appareil génital mâle chez le coq est très important, pour une bonne interprétation des variations de différents paramètres de la qualité spermatique.

L'appareil génital mâle de l'espèce avicole présente quelques particularités anatomiques et physiologiques comparées à celui des mammifères. L'appareil reproducteur mâle chez le coq (*Gallus gallus domesticus*) est relativement plus simple que celui des mammifères (**Nicaise, 2015**). Les gonades mâles sont représentées par les deux testicules. Chaque testicule est recouvert par une capsule conjonctive blanche, l'albuginée, dont la surface est parcourue par des vaisseaux sanguins.

Les testicules sont liés aux canaux efférents qui gagnent le canal épидидymaires (figure 15). Ces derniers se prolongent par les canaux déférents qui débouchent dans l'urètre lequel aboutit au cloaque (**Kwon et al., 1995 ; Simões et al., 2004 ; Razi et al., 2010 ; Abd-Elmaksoud et al., 2014**).

La partie épидидymaire est située à la surface dorso-médiane des testicules et comprend le rete testis, les canaux efférents, les conduits de liaison et un canal épидидymaire court et non différencié (figure 25), divisé en deux parties proximales et distales, bordée par un épithélium non cilié, et structurellement similaire dans toute la longueur (**Nixon et al., 2014**). La plupart des espèces aviaires ne possèdent pas de glandes annexes, mais possèdent des cellules sécrétoires dans l'épithélium des canaux excréteurs (**Abd-Elmaksoud et al., 2014**).

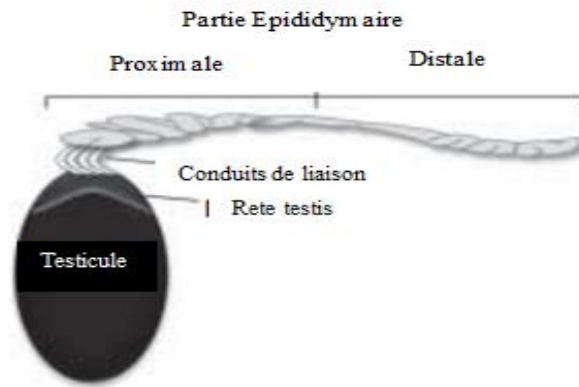


Figure 25. Structure de la partie épидидymaire chez le coq (*Gallus gallus domesticus*) (Nixon et al., 2014)

Selon **Salting et al. (2016)**, le choix du sperme de bonne qualité est basé sur les normes suivantes :

1. La couleur : doit être indemne de toute contamination causée par des produits cloacaux,
2. Le volume supérieur à 0.3 ml,
3. La mobilité des spermatozoïdes supérieure à 65%,
4. La concentration du sperme supérieure à 1×10^9 spz/ml.

III.1.1 Volume spermatique

Le volume spermatique moyen récolté au niveau de l'épididyme est de $0,13 \pm 0,05$ ml inférieur à celui du volume spermatique récolté du canal déférent $0,72 \pm 0,12$ ml, il est plus bas que les normes rapportées dans la littérature (supérieure à 0.3ml) (**Salting et al., 2016**). Cela est bien expliqué par la taille et la position du canal épидидymaire par rapport au canal déférent (revoir la structure anatomique de l'appareil reproducteur chez le coq).

Le volume de sperme est généralement faible et la concentration de spermatozoïdes très élevée chez l'espèce avicole « *Gallus gallus domesticus* », de sorte que le plasma séminal est en quantité relativement faible, mais il contribue à des changements très rapides dans le métabolisme et les fonctions des spermatozoïdes (**Santiago-Moreno et Blesbois, 2020**).

Des études anatomiques ont révélé un large sac qui se compose de deux parties non discrètes dans la région frontalo-ventriculaire des testicules entre l'épididyme et le canal déférent, qui était étroitement lié à l'épididyme en partie ventrale et en partie latérale aux reins. Son rôle est le stockage du sperme, il est l'équivalent de la queue de l'épididyme chez les mammifères (**Razi et al., 2010**).

III.1.2 Concentration spermatique

La valeur moyenne de la concentration spermatique récupérée du canal épидидymaire est de $250 \pm 137,84 \cdot 10^6$ spz/ml, alors que celle récupérée du canal déférent est de $5333,33 \pm 1861,90 \cdot 10^6$ spz/ml. Une différence hautement significative ($p < 0,001$) a été observée entre le nombre de spermatozoïdes récupéré dans les deux compartiments (canal épидидymaire et canal déférent).

Le nombre de spermatozoïdes récupéré du canal épидидymaire est inférieur de la norme (supérieure à 1×10^9 spz/ml) ; alors que le nombre de spermatozoïdes au niveau du canal déférent dépasse cinq fois les normes. Chez la plupart des espèces avicoles, le sperme éjaculé est caractérisé par une forte concentration de spermatozoïdes jusqu'à plus de 10 milliards de spz/ml.

Une particularité de la reproduction chez le coq comparé aux mammifères, l'intervalle entre les spermatogonies de type B et les spermatozoïdes est relativement court (au niveau du tube séminifère), sachant que la durée de la spermatogenèse est environ 13 à 14 jours (**Noirault et al., 2006 ; Santiago-Moreno et Blesbois, 2020**). Après leurs évacuations vers le rete testis, les spermatozoïdes sont rapidement transportés à travers l'épididyme vers les canaux déférents (**Blesbois et Brillard, 2007**). Le temps de survie des spermatozoïdes dans les canaux déférents est ≤ 7 jours (**Santiago-Moreno et Blesbois, 2020**).

Selon **Santiago-Moreno et Blesbois (2020)**, lors de la spermatogenèse, un nombre élevé de spermatozoïdes sera produit dans de très petits volumes de sperme. Le sperme chez le coq, présente généralement une concentration exceptionnellement élevée de spermatozoïdes avec relativement peu de plasma séminal. Contrairement aux mammifères, il n'existe pas de glandes identifiées, telles que la prostate ou les vésicules séminales.

Les composants du plasma séminal chez le coq proviennent des canaux efférents (partie distale de l'épididyme), du canal déférent, y compris la dilatation terminale qui pénètre dans le cloaque par un canal éjaculateur (**Jones, 1998 ; Long, 2014**). Chez les espèces aviaires, les canaux efférents sont composés de plus de 70 % de la partie épидидymaire, ce qui suggère que les canaux efférents représentent un composant plus important que le canal épидидymaire et le rété testis (**Ilio et Hess, 1994 ; Janssen et al., 2000**).

Les principales fonctions des canaux efférents sont la réabsorption des liquides, le transport et la concentration des spermatozoïdes, la phagocytose des spermatozoïdes et la sécrétion de protéines (**Janssen et al., 2000**). Ces fonctions sont essentielles pour la concentration et la maturation des spermatozoïdes et sont contrôlées par plusieurs hormones, dont les androgènes et la vitamine D3 (**Oliveira et al., 2011**).

III.1.3 Motilité massale

La motilité massale (MM) est une caractéristique importante dans la prise de décision sur l'acceptation ou le rejet d'un éjaculat pour les traitements ultérieurs et son utilisation dans l'insémination artificielle ou pour la cryoconservation (**Briand-amirat et al., 2006 ; Bharatkumar et Siddiquee, 2013; Hamadou et al., 2015**).

Colas (1981), explique cela par le fait que la motilité massale n'est pas liée au pouvoir fécondant du sperme, et que son évolution ne donne qu'une idée vague sur la proportion des cellules vivantes dans la semence. En effet, la valeur moyenne de la motilité massale obtenue dans le cadre de cette étude est variée de façon significative d'un compartiment à l'autre ($P < 0,01$), elle est de $65,83 \pm 4,92\%$ au niveau de l'épididyme alors qu'au niveau du canal déférent est de $80,83 \pm 7,36\%$.

Cette valeur est acceptable pour les deux compartiments (épididyme et canal déférent), en comparaison avec les normes citées par **Salting et al. (2016)**, à partir de laquelle, ce paramètre est considéré comme une bonne indication de la qualité du sperme, avec une capacité de fertilisation acceptable et une bonne fertilité (**Farrell et al., 1998 ; Salting et al., 2016**), et aussi à partir de laquelle le sperme est accepté pour l'insémination artificielle ou la cryoconservation (**O'Hara et al., 2010 ; Salting et al. (2016)**). **Nixon et al. (2014)** ont déterminé une valeur de la motilité massale des spermatozoïdes récupérés du testicule de 11,33%, avec une valeur de 78% apprécié du canal déférent.

Alors que **González-Santos et al. (2019)**, ont observé une valeur de motilité massale des spermatozoïdes testiculaires de 20 %, alors que cette valeur était de 80 % au niveau du canal déférent. Ce sont des valeurs presque comparables à nos résultats $80,83 \pm 7,36\%$ (au niveau du canal déférent) avec $65,83 \pm 4,92\%$ (épididyme).

Ahammad et al., (2011) ont annoncé dans leurs travaux que chez le coq les spermatozoïdes provenant des testicules, de l'épididyme et des canaux déférents avaient une motilité faible, moyenne et élevée, respectivement. L'augmentation de la motilité des spermatozoïdes les rend énergiques en raison de leur contenu mitochondrial (une trentaine chez le coq) (**Blesbois, 2011 ; Sasanami et al., 2012**).

Les résultats de **Munro (1935 et 1938)** et **González-Santos et al. (2019)**, sont confirmés par notre étude, la mobilité des spermatozoïdes augmente progressivement dans l'épididyme, mais la mobilité maximale a été observée dans le canal déférent. Le spermatozoïde aviaire n'est pas mobile dans les testicules, bien qu'il ait été prouvé qu'il est capable de féconder les œufs lorsqu'il est récolté des testicules. Selon **Ashizawa et Sano (1990)**, à la sortie du testicule, les spermatozoïdes possèdent déjà l'essentiel de leur capacité de motilité et un pouvoir fécondant non négligeable.

L'importance de la motilité massale est prouvée par le fait que les spermatozoïdes chez l'espèce avicole, subissent une pression de sélection intense dans la région vaginale de l'oviducte, et que les spermatozoïdes peu mobiles sont incapables de traverser le vagin pour atteindre l'infundibulum (**Nixon et al., 2014**).

Le plasma séminale chez la volaille est un fluide complexe composé par des lipides, des protéines, des ions (Na^+ , K^+ , Cl^- , Ca^{2+} , et Mg^{2+}), l'hormone (testostérone), des acides aminés et des enzymes. Il convient de noter que la mobilité des spermatozoïdes chez le coq dépend de l'activité de la phospholipase A2 dépendante du Ca^{2+} , qui fournit des acides gras à longue chaîne pour la β -oxydation au sein de la matrice mitochondriale (**Froman et Kirby, 2005 ; Santiago-Moreno et Blesbois, 2020**).

Chez l'espèce avicole, il a été prouvé depuis longtemps que la présence du plasma séminale dans le sperme, contribue et stimule la motilité des spermatozoïdes. Il est impliqué dans des échanges clés avec les spermatozoïdes, qui influencent grandement la capacité de la fécondation des gamètes (**Santiago-Moreno et Blesbois, 2020**).

III.1.4 Pourcentage moyen de spermatozoïdes vivants

Le pourcentage moyen de spermatozoïdes vivants analysé à partir de l'épididyme et du canal déférent est de $53,17 \pm 9,13\%$ vs $86,50 \pm 2,59\%$ respectivement, par conséquent le pourcentage de spermatozoïdes morts trouvé dans la présente étude est de 46.83% dans l'épididyme plus élevée par rapport à 13.5% dans le canal déférent. La viabilité des spermatozoïdes est l'un des paramètres de qualité du sperme les plus importants, afin de connaître la capacité de fécondation du spermatozoïde.

González-Santos et al., (2019) ont évalué le pourcentage de spermatozoïdes vivants dans les testicules (91,40 %) et après éjaculation (96,46 %). Ces valeurs étaient similaires à celles de **Herrera et al. (2005)** et de **Santiago-Moreno et al. (2011)**. La fécondation in vitro (FIV) nécessite la plus grande quantité de spermatozoïdes vivants (**Mizushima et al., 2014**). La valeur du pourcentage des spermatozoïdes vivants rapportés par **Feyisa et al. (2018)** (éjaculât) pour les spermatozoïdes vivants chez différentes populations de coq est de 77,1% à 85,1%.

III.1.5 Pourcentage de spermatozoïdes anormaux (téatospermie)

La morphologie des spermatozoïdes a été recommandée comme l'une des caractéristiques qualitatives la plus essentielle du sperme chez l'espèce avicole. Dans notre étude aucune différence significative ($p > 0,05$) n'a été constatée entre le pourcentage de spermatozoïdes anormaux dans les deux compartiments : l'épididyme $21,17 \pm 3,37\%$ et canal déférent $20,67 \pm 13,43\%$. **Adam (1995)** qui prétend que le sperme de bonne qualité ne doit pas contenir plus de (20%) de spermatozoïdes anormaux. Si l'éjaculât contient plus de 25% de pourcentage des spermatozoïdes anormaux, cela peut entraîner une réduction de la fécondité (**Bearden et al., 2004**).

Les paramètres observés dans l'étude de **González-Santos et al., (2019)** concernant la morphologie des spermatozoïdes ont montré que 89,2 % des spermatozoïdes normaux se trouvaient dans les testicules et 91,40 % dans l'éjaculat. Ces pourcentages sont en accord avec ceux obtenus par **Tabatabaei et al., (2009)** chez la même espèce.

Selon les proportions les plus élevées des défauts morphologiques observés se situaient au niveau de la tête et de la queue des spermatozoïdes dans toutes les races, ce qui suggère que ces parties des spermatozoïdes sont plus sensibles aux facteurs environnementaux (**Feyisa et al., 2018**). Les défauts au niveau des spermatozoïdes pourraient affecter la capacité de ces derniers à atteindre et à pénétrer un ovule.

Habituellement, les anomalies des spermatozoïdes indiquent des perturbations de la spermatogenèse et cela pourrait être attribué à l'âge, à l'alimentation... (**Mamun Tarif et al., 2013**). Néanmoins, la proportion de spermatozoïdes morphologiquement normaux dans la présente étude était suffisamment bonne pour une cryoconservation et la création d'une banque à base de sperme chez le coq (*Gallus gallus domesticus*) de la population locale algérienne.

III.1.6 Condensation de la chromatine

Durant la spermatogenèse, il y a substitution graduelle des histones somatiques (riches en lysine) par des histones spécifiques du testicule et finalement par des protamines (riches en arginine et cystéine). Il s'agit d'évaluer la maturité nucléaire des spermatozoïdes. La coloration par le bleu d'aniline, en colorant les histones, permet d'évaluer indirectement l'état de condensation de la chromatine. Le bleu d'aniline acétifié marque sélectivement les histones persistantes et donc les spermatozoïdes immatures qui sont alors colorés en bleu foncé tandis que les spermatozoïdes matures sont incolores (**Roux et al., 2004 ; Khassal, 2009**).

La condensation (compaction) de la chromatine du spermatozoïde est nécessaire à la protection du génome paternel au cours du transit du spermatozoïde dans les voies génitales ainsi que dans les différentes phases de progression au cours de la fécondation. Les protamines sont les protéines nucléaires les plus abondantes dans les spermatozoïdes matures qui remplacent les histones pendant la spermatogenèse. La carence en protamine et l'augmentation des restes d'histones dans les spermatozoïdes entraîne une condensation prématurée de la chromatine, cause d'échec de la fécondation et du développement des embryons (**Oliva, 2006**).

Dans la présente étude, la coloration à base de bleu d'aniline indiquant la présence de protéines de protamine au niveau des spermatozoïdes récupérés de l'épididyme $78,17 \pm 4,75\%$ et de $76,17 \pm 6,62\%$ au niveau du canal déférent. Nos résultats sont proches à ceux de **Shanmugam et al. (2016)** qui ont travaillé sur deux souches différentes. Les observations faites dans la présente étude suggèrent que la méthode de coloration au bleu d'aniline pourrait être utile pour déterminer l'état de condensation de la chromatine des spermatozoïdes.

Il est à noter que les connaissances actuelles sur la protamine des spermatozoïdes sont principalement celles obtenues à partir d'études sur le sperme de mammifères. Des informations supplémentaires sont nécessaires en ce qui concerne le processus de condensation de la chromatine dans le sperme de coq « *Gallus gallus domesticus* » pour l'application régulière du test au bleu d'aniline dans l'étude de la qualité spermatique.

III.2 Étude comparative entre deux méthodes de récolte du sperme post-mortem chez le coq adulte

La plupart des recherches effectuées sur la récolte et l'évaluation du sperme non éjaculé ont porté sur des espèces de mammifères, chez lesquelles la viabilité du sperme épididymaire est étonnamment élevée, même après cryoconservation (**Soler et al., 2005**). De nombreuses techniques de collecte de sperme post-mortem ont été décrites pour les espèces de mammifères, mais leur utilisation chez le coq *Gallus gallus domesticus* est rare.

Cette étude a été la première à comparer deux techniques de prélèvement, par flusching (rétrograde) et flot-up (flottaison), en post-mortem, de sperme de coq de la population locale de l'est algérien. Au tableau 10 sont présentés les résultats comparatifs des paramètres évalués sur le sperme récolté à partir du canal déférent par les deux méthodes.

III.2.1 Volume spermatique

Nos résultats indiquent une différence significative ($p \leq 0.01$) pour le volume spermatique récolté par les deux méthodes rétrograde et flot-up, avec les valeurs respectives de $0,72 \pm 0,12$ ml et $0,17 \pm 0,08$ ml. Le volume récolté par la méthode flot-up enregistré dans nos résultats ($0,17 \pm 0,08$ ml), est inférieur à ceux rapportés par **Mavi et al., (2017)** en race Assel ($0,36 \pm 0,08$ ml) et Kadaknoth ($0,30 \pm 0,06$ ml). Ce même résultat ($0,30$ ml) est obtenu par **Mphaphathi et al., (2016)** chez le coq Venda, mais par la méthode du massage abdominal. Cette différence de volume spermatique entre les deux méthodes de récolte est due au protocole de prélèvement des deux techniques, rétrograde et flot-up (cf partie méthodologie).

III.2.2 Concentration spermatique

La concentration du sperme, récupéré par les méthodes flusching (rétrograde) et flot-up, était respectivement de $3,33 \pm 1,36 \times 10^6$ spz/ml et $1,75 \pm 0,76 \times 10^6$ spz/ml, toutefois une différence non significative est relevée ($P \geq 0,05$). Les deux méthodes utilisées dans notre étude donnent des concentrations spermatiques inférieures à celle obtenue ($6,8 \times 10^6$ spz/ml) par massage abdominal sur le coq Venda (**Mphaphathi et al., 2016**).

Siudzinska et Lukasiewicz (2008), ont annoncé une moyenne de concentration du sperme de $4,7 \times 10^6$ spz /ml, chez le coq polonais (blanc et noir) et $4,2 \times 10^6$ spz/ml, chez la race Black minorcas. Alors que selon **Tuncer et al. (2008)** et **Obidi et al., (2008)**, les concentrations de sperme signalées ont été de $2,4 \times 10^6$ Spz /ml, chez le coq Gerse et de $3,6 \times 10^6$ spz /ml, chez le coq Shikabrown, semblables aux présents résultats avec la méthode rétrograde récupérer du canal déférent. La concentration spermatique varie à la fois au sein d'un même individu et entre les individus d'une même espèce (**Hicks, 1992 ; Glover, 2012 ; Salting et al., 2016**).

Les résultats de **Salting et al., (2016)** impliquent que la concentration des spermatozoïdes obtenus du canal déférent était comparable avec les concentrations des spermatozoïdes dans les échantillons obtenus via la méthode de massage dorso abdominal.

Selon l'étude de **Villaverde-Morcillo et al. (2016)**, quel que soit le dilueur utilisé, le nombre de spermatozoïdes récupérés par la méthode de rinçage (rétrograde) est nettement plus élevé que par la méthode de flot-up ($5,9.10^6$ spz/ml vs $3,4.10^6$ spz/ml de sperme par canal déférent ($p \leq 0,05$), en effet, le nombre était proche à celui enregistré par le sperme éjaculé ($6,3.10^6$ spz/ml).

Selon les résultats de **Villaverde-Morcillo et al. (2016)**, le nombre de spermatozoïdes récupéré à partir d'un seul canal déférent par la méthode de rinçage, était presque le même nombre de spermatozoïdes récolté des éjaculats.

La technique de flot-up est plus facile à réaliser et plus rapide que la méthode rétrograde, mais les échantillons de sperme étaient généralement contaminés avec des cellules sanguines. La présence de ces derniers peut augmenter la production de l'oxygène (ROS), ce qui affecte négativement la qualité des spermatozoïdes lors du stockage à long terme (**Aitken et Bennetts 2006**).

III.2.3 Motilité massale

Aucune différence significative ($p > 0,05$) n'a été observée entre la valeur moyenne de la motilité massale des spermatozoïdes récoltés par la méthode rétrograde $77,50 \pm 6,89\%$ et la méthode dite flop-up $75,83 \pm 8,61\%$. Par contre, la meilleure valeur de la motilité massale est celle obtenue à partir de sperme récolté par la technique rétrograde. Les mêmes résultats sont observés par **Salting et al. (2016)**, avec des valeurs plus basses 65.5 ± 4.97 vs $65 \pm 4.71\%$. Il faut prendre en considération la pression et la force exercée sur les spermatozoïdes lors de la récolte par rinçage (rétrograde) (**Bouaziz et al. 1998 ; Fioravanti et al., 2005 ; Santiago-Moreno et al., 2007**).

III.2.4 Pourcentage de spermatozoïdes vivants

Le pourcentage des spermatozoïdes vivants, récupérés par la méthode flot-up, était de $74.00 \pm 10.15\%$, tandis que, celui récupérés par la méthode de rinçage, était de $75.00 \pm 10.39\%$. Les résultats ont indiqué que la méthode de récolte n'a aucun effet sur le pourcentage des spermatozoïdes vivants. La viabilité obtenue dans cette étude était inférieure à celle obtenue par la méthode flot-up ($85.65 \pm 7.88\%$) et par la méthode de hachage ($84.24 \pm 8.79\%$) (**Salting et al., 2016**).

Le pourcentage de spermatozoïdes vivants dans les canaux excréteurs pourrait être pareil à celui des échantillons de l'éjaculation pour les poulets domestiques, car le spermatozoïde mature devient pleinement fertile dans le canal déférent. C'est également dans le canal déférent que sont stockés les spermatozoïdes produits par les testicules jusqu'à l'accouplement du coq.

Toutefois des différences dans le taux de viabilité des spermatozoïdes peuvent être dépendant de la race, de l'âge, du climat, de la situation géographique, et de la nutrition (**Das et al., 2016 ; Kuzlu et Taskin, 2017. Mavi et al., 2018**).

III.2.5 Pourcentage des spermatozoïdes anormaux ou tératospermie

Comme exposé au tableau 10, le pourcentage de spermatozoïdes anormaux dans les échantillons recueillis par les méthodes de flot-up et de rinçage, est respectivement de $30.33 \pm 4.68\%$ et de $30.33 \pm 4.68\%$. La méthode de prélèvement n'a aucun effet sur le pourcentage d'anomalie des spermatozoïdes (tératospermie).

Le taux des anomalies trouvé sur du sperme éjaculé est de $4.52 \pm 10\%$ à $23.33 \pm 6.67\%$ chez différentes souches aviaires (**Tarif et al., 2013 ; Churchil et al., 2014**). Il est respectivement de $41.04 \pm 10.19\%$ à $44.1 \pm 0.26\%$ chez la race Ross-308 et les poulets indigènes en Iran (**Tabatabaei et al., 2009**).

Les résultats obtenus sont propres à la souche locale algérienne et plus précisément pour le sperme récolté en post mortem ; par deux méthodes : le flot -up et la rétrograde, et ne peuvent être comparés à ceux d'autres travaux ne présentant pas les mêmes conditions.

III.3 Les effets de conservation du canal déférent à différentes températures sur la qualité spermatique

Les banques de gènes pour l'espèce aviaire sont en cours de création. Malheureusement, la collecte de sperme chez les oiseaux n'est pas sans difficulté, et nos connaissances sur la conservation du sperme aviaire à court ou à long terme (cryoconservation), à différentes températures doit être améliorées. La température de stockage est l'un des facteurs les plus facilement contrôlables de l'environnement et les influences de la température ont reçu une attention considérable. Les effets de la température sur la qualité du sperme durant la conservation in situ, 2h et 24h après abattage à 4°C et 20 °C, sont exposés dans le tableau 12.

III.3.1 Motilité massale

Dans la présente étude, la motilité massale des spermatozoïdes recueillis du canal déférent, après conservation de ce dernier pendant 24h à 4 °C est de 55.00±5%, tandis qu'à 20 °C elle est de 83±7.21%. Alors que la motilité massale après 2h d'abattage est de 81,00±2,19%. Selon l'étude statistique, la durée et la température de conservation agissent d'une façon très hautement significative ($p \leq 0.001$) sur la motilité massale.

La température de conservation joue un rôle important dans le maintien de la motilité des spermatozoïdes. Le plasma séminal aviaire, qui est produit dans le testicule, l'épididyme et le canal déférent (aucune glande sexuelle accessoire n'est présente chez le coq) est fonctionnellement important puisqu'il stimulant la motilité des spermatozoïdes (**Marzoni et al., 2013**).

Les échantillons de sperme conservés à 5 °C révèlent une mobilité globale de plus de 50% après 24h (**Mphaphathi et al., 2016**). Les échantillons de sperme de la race Venda, enregistrent une mobilité de 55.0 ± 8.0 après 24h à 5°C en conservation in vitro, tandis que les échantillons de sperme conservés à 25°C causent une réduction drastique de 30.6 ± 6.1 après 24h (**Mphaphathi et al., 2016**).

Selon **Clacke et al. (1982)**, le sperme de coq conservé à 41°C diminue drastiquement la mobilité, comparée à celui conservé à 5.15 et à 25 °C. À basse température (4°C), il a été rapporté qu'il avait un effet néfaste lors de la conservation in vitro, associé à l'activation de la phospholipase et aux modifications du pH pendant le refroidissement (**Aitken et Bennetts, 2006 ; Douard et al., 2000 ; Sarkar, 2020**).

Chez les espèces aviaires, les spermatozoïdes éjaculés peuvent être stockés dans la lumière des tubules de stockage des spermatozoïdes (chez la poule) et peuvent conserver leur capacité de fécondation jusqu'à 15 semaines à une température corporelle de 41°C (**Sasanami et al., 2013**). Le processus par lequel les spermatozoïdes restent dans l'appareil reproducteur féminin pendant une période plus longue n'est pas encore totalement compris.

Nous disposons de peu d'informations sur le mécanisme de régulation du stockage à long terme du sperme dans des conditions in vivo.

III.3.2 Pourcentage de spermatozoïdes vivants

La durée et la température de conservation du canal déférent ont un effet significatif ($p < 0,01$) sur le pourcentage des spermatozoïdes vivants, pendant 24h à 4°C ($48,33 \pm 3,51\%$) et à 20°C ($81 \pm 7,21\%$). La meilleure valeur de la viabilité est celle appréciée après la conservation in situ pendant 24 h à 20 °C.

Le pourcentage des spermatozoïdes vivants analysé 2 h après abattage est meilleur que celle récolté après 24 h de conservation in situ à 4 °C. **Dumpala et al., (2006)** ont rapporté que le nombre de spermatozoïdes morts dans le sperme de coq stocké à 41°C était significativement plus élevé par rapport à ceux stockés à 4 ou 21°C.

Selon l'analyse de **Sarkar (2020)**, un pourcentage élevé de spermatozoïdes viables est généralement trouvé à basse température (environ 4°C).

III.3.3 Pourcentage de spermatozoïdes anormaux et l'intégrité acrosomiale

En revanche, aucune différence significative n'a été observée entre le nombre de spermatozoïdes anormaux ($32 \pm 4,36\%$, $29,67 \pm 2,52\%$) et entre les spermatozoïdes avec un intact acrosome ($75,33 \pm 2,52\%$, $81,67 \pm 7,51\%$), récupéré après 24 h de conservation du canal déférent à 4 °C et 20°C. En plus sont proche à la valeur analysée après 2h d'abattage. Alors la température n'a pas d'effet sur la morphologie des spermatozoïdes ni sur l'acrosome.

Les effets du stockage in situ sur la forme et l'intégrité acrosomique des spermatozoïdes n'ont jamais été étudiés chez les espèces aviaires malgré son importance majeure pour la gestion de la reproduction.

Les spermatozoïdes sont des gamètes filiformes qui comportent une tête, une pièce intermédiaire et un flagelle. La tête contient l'acrosome et le noyau. L'acrosome est conique et assez petit ($2,5 \mu\text{m}$ de long, $0,5$ de large chez le coq) (**Santiago-Moreno et al., 2016 ; Blesbois, 2011**).

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, parmi elles, l'acrosine (**Korn et al., 2000**).

D'autres enzymes hydrolytiques sont également présentes comme la hyaluronidase et la N-acetyl-beta-glucosaminidase. Ces enzymes pourraient contribuer à stimuler le déclenchement de la réaction acrosomique (**Lemoine et al., 2011**).

L'une des caractéristiques spécifiques de la biologie du sperme de l'espèce aviaires est l'absence de capacitation avant la réaction acrosomique (**Lemoine et al., 2011**).

La réaction acrosomique est une réaction d'exocytose qui existe chez les spermatozoïdes de toutes les espèces à fécondation interne et chez certaines espèces à fécondation externe (**Blesbois, 2011**).

Chez les oiseaux, elle permet de libérer le stock enzymatique facilitant la traversée de la membrane périvitelline interne (MPVI), la mobilisation de calcium qui pourrait (entre autres) contribuer à l'activation de l'ovocyte et, sans doute, l'accessibilité des sites de fusion entre la membrane plasmique des spermatozoïdes et de l'ovocyte (**Bakst et al., 1977 ; Okamura et Nishiyama, 1978 ; Lemoine et al., 2011**).

Au cours de la réaction acrosomique, la membrane plasmique et la membrane externe de l'acrosome se rompent et fusionnent, ce qui conduit à leur vésiculation et finalement à leur disparition de la région acrosomique (**Okamura et Nishiyama, 1978**). La capacité des spermatozoïdes de poulet à subir la réaction acrosomique est très importante pour le succès de la fécondation.

Conclusion

Les résultats de cette étude ont prouvé que les échantillons de sperme de bonne qualité peuvent être recueillis du canal déférent chez le coq de population locale, avec des paramètres comparables de sperme éjaculé. Les échantillons collectés du canal déférent sont une meilleure source en post mortem pour de futures études sur la semence du coq, en ce qui concerne les méthodes de développement de la cryoconservation du sperme de l'espèce avicole, et finalement, dans la cryoconservation pour des ressources génétiques de valeur. Dont le cas ou des difficultés de récolte par massage abdominal ou dans certain cas de mortalité subite.

Dans cette étude, l'extraction de sperme à partir du canal déférent, chez le coq indigène algérien, était rendue possible et la différence entre la qualité du sperme récolté par la méthode flot-up et la méthode de rinçage, étaient aussi étudiées. La méthode de rinçage permet d'obtenir un nombre élevé du sperme. Cette technique peut être facilement réalisée sur les oiseaux sauvages et domestiques trouvés morts ou sérieusement blessés, ce qui pourrait être intéressant pour le programme de reproduction et de conservation.

Cette étude montre aussi qu'il est possible de préserver le sperme de coqs indigènes algériens à 4 °C et 20 °C pendant 24 h. Il est conclu que le sperme de haute qualité prélevé du canal déférent de coq local peut être destiné à des études plus approfondies sur la cryoconservation afin de créer une banque de gènes de la population aviaire locale algérienne.

Deuxième volet

Caractérisation du sperme post-mortem chez le Bouc

Effet de la température de conservation des testicules de bouc, sur la qualité du sperme épидидymaire : Première étape vers la cryobanque de races locales algériennes.

Introduction

La deuxième partie de notre projet a fait l'objet d'une publication sur la population locale caprine : H. OUENNES, F. AFRI BOUZEBDA, Z. BOUZEBDA, S. MEDJEDOUB, A. DJAOUT, M. ADNANE SMADI. Effet de la température de conservation des testicules de bouc, sur la qualité du sperme épидидymaire : Première étape vers la cryobanque de races locales algériennes. *Revue de Médecine vétérinaire*. 2019, 170, 7-9, 184-192

La préservation du sperme épидидymaire d'animaux morts ou abattus a été reportée chez plusieurs espèces domestiques et sauvages : cerfs (**Guerin et al., 2003, Soler et al., 2003; Martinez Pastor et al., 2006; Santiago Moreno et al., 2009**), bovins (**Martins et al., 2007**), renards (**Verdier, 2002**) ; chevaux (**Cary et al., 2004**) ; camelins (**Abselkhalek et al., 2009**) ; tégu noir et blanc (**Young et al., 2013**) ; singes rhésus (**Dong et al., 2008**) ; crocodiles (**Johnston et al., 2014**), chèvres (**Blash et al., 2000**) ; bouquetins (**Santiago Moreno et al., 2006**) et ovins (**Ehling et al., 2006 ; Karja et al., 2010 ; Turri et al., 2013**). Cependant, l'extraction du sperme épидидymaire est parfois difficilement réalisable dans les régions isolées (éloignées), en raison du manque de structure (laboratoire, centre de recherche..) et de compétence, à proximité des zones d'élevage des races locales.

Plusieurs études ont été menées pour déterminer la cause de la détérioration des spermatozoïdes épидидymaires récupérés en post-mortem en fonction de certaines conditions (température et durée post-mortem) chez différentes espèces : bovins (**Martins et al., 2009**) ; babouins et chimpanzés (**O'brien et al., 2003**) ; cerfs rouges (**Martinez Pastor et al., 2006 ; Soler et al., 2003**) ; moutons (**Kaabi et al., 2003**) ; ruminants sauvages (**Killian et al., 2000 ; Bisset et al., 2005 ; Fernandez-Santos et al., 2011**).

Blash et al. (2000) ont démontré que, le sperme épидидymaire de l'espèce caprine, peut être cryoconservé avec succès et utilisé en fécondation *in vitro* et en insémination artificielle, s'il est immédiatement traité juste après la mort de l'animal.

Cette étude permet d'évaluer la qualité avant la congélation et après congélation du sperme épидидymaire du bouc local en fonction de la température de stockage des testicules et du temps écoulé entre la mort de l'animal et la récupération du sperme (0, 24, 48 et 72 h), pour établir les protocoles optimaux de la cryoconservation du sperme épидидymaire dans cette espèce.

I. Matériels et Méthodes

I.1 Matériels

I.1.1 Site expérimental

Cette étude a été débutée en mars 2017 jusqu'au juillet 2018 au niveau du centre de Recherche en Biotechnologie « CRBt ». Le site expérimental est déjà décrit dans la première partie de notre thèse.

I.1.2 Matériels biologiques

Le matériel est constitué de 40 paires de gonades (figure 27), prélevées en post-abattage, sur des boucs dont l'âge moyen est de 3.5 ± 0.5 ans, de population locale (différents caractères phénotypiques), de provenances diverses de l'Est algérien (figure 26).



Figure 26. Variété de la population locale caprine en Est Algérien

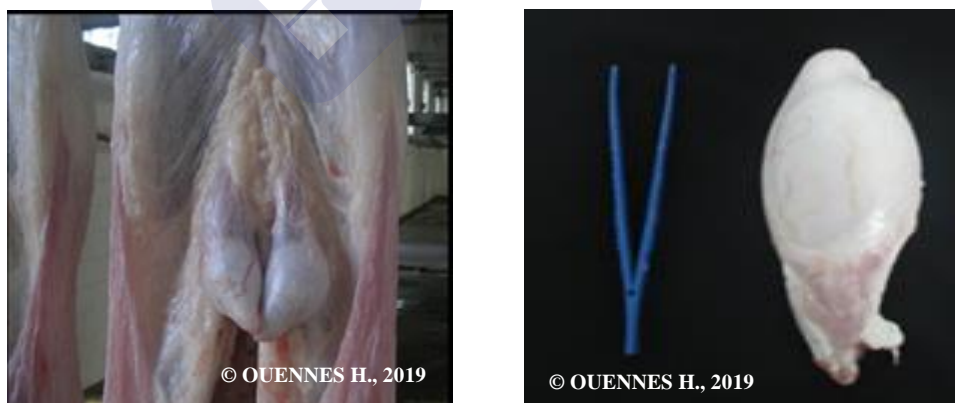


Figure 27. Testicule de Bouc.

I.1.3 Matériels non biologiques

I.1.3.1 Matériels de prélèvement du sperme

Le matériel de prélèvement spermatique, a été déjà détaillé dans le premier volet de notre travail (la caractérisation du sperme post-mortem chez le coq fermier dans l'est de l'Algérie) sauf :

- Une glacière pour le transport des échantillons au laboratoire.
- Une pince à clamp, utilisée pour le cathétérisme du canal déférent lors du rinçage.

I.1.3.2 Matériels d'appréciation de la qualité spermatique et de congélation

L'étude de la qualité du sperme épидидymaire chez le bouc nécessite certains matériels et réactifs, en dehors du matériel déjà cité au premier volet (la caractérisation du sperme post-mortem chez le coq fermier dans l'est de l'Algérie) :

- Un spectrophotomètre pour petit ruminant (AccuRead, IMV Technologie, France),
- Un analyseur de sperme assisté par ordinateur (CASA) (figure 28) (analyseur de classe de sperme, SCA Microptic, SL, version 3.2.0, Barcelone, Espagne),
- Bain-marie réglé à $37,5 \pm 1$ °C (figure 29).
- Centrifugeuse (figure 30),
- Hotte microbiologique : Utiliser pendant toute la procédure de prélèvement et conditionnement du sperme (figure 31).
- Osmomètre (pour mesurer la pression osmotique de la fraction de dilution) (figure32),
- Balance de précision OHAUS (figure 33).
- pH mètre (mesure le ph mètre de la fraction de dilution) (figure34),
- Lame de marque Leja® à 4chambre (20 microns), Leja Product B.V. uzernestraat 10 (figure 35),
- Paillettes de congélation de 0,25 ml (Cryo Bio System, groupe IMV Technologies, l'Aigle, France),
- Citerne d'azote liquide pour 10 litres, avec tout un équipement (consistère, visotube, baguettes) (figure 36,37), et matériel de sécurité contre les brulures de l'azote liquide (gants, lunettes, bottes),
- Boîte en polystyrène (figure 38),

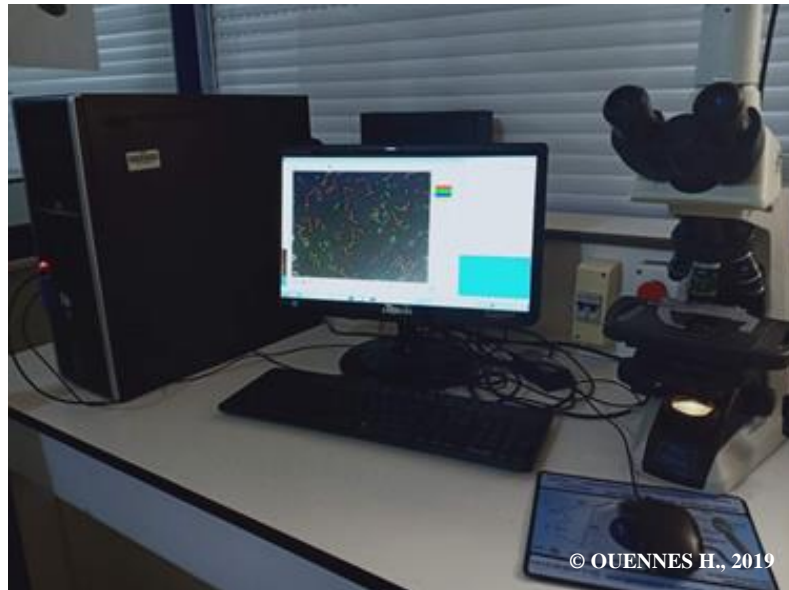


Figure 28. Analyseur de sperme assisté par ordinateur (CASA)

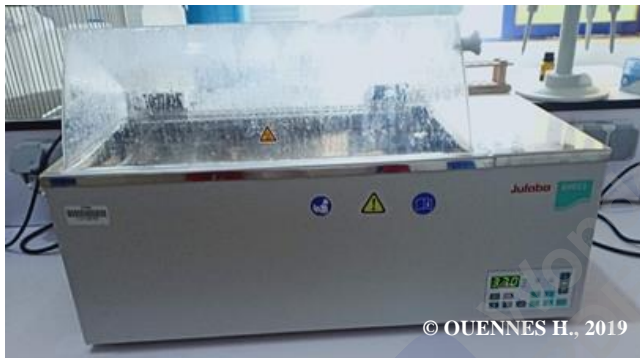


Figure 29. Bain marie (Julabo/SW23)



Figure 30. Centrifugeuse



Figure 31. Hotte (SHINSAENG, CLEAN BENCH).



Figure 32. Osmomètre (VOGEL OM 815)



Figure 33 . Balance de précision



Figure 34. pH mètre



Figure 35. Lame Leja®



Figure 36. Visotube



Figure 37. Canistère



Figure 38. Boîte en polystyrène (3L)

I.1.3.3 Produits chimiques

Tous les produits chimiques ont été obtenus auprès de Sigma – Aldrich Company groups (St. Louis, MO) : Acide Citrique (Cat.C2404), Fructose (Cat.F3510), Glycèrol (Cat.G15523), Acide Hydrochloride 37% (Cat.258148), Tris-(hydroxyméthylaminométhane) (Cat. 93352), Acétate d'ammonium, Formaldéhyde, Acide perchlorique, Citrate de sodium, Gentamycine (antibiotique), Colorant : Eosine Nigrosine, l'alcool polyvinylique : poudre de bouchage des paillettes.

I.2 Méthodes

I.2.1 Identification de l'âge des boucs

En l'absence de boucle d'identification, la dentition est le seul moyen de l'estimation de l'âge chez les caprins (Sangaré *et al.*, 2005 ; Vatta *et al.*, 2006). Le nombre (tableau 13) et la forme des dents (incisives) (figure 39), ont été utilisés pour estimer l'âge des petits ruminants (Hall, 1991 ; Desta, 2009), en plus des informations données par l'éleveur.



Figure 39. Détermination de l'âge chez le bouc.

Tableau 13. Détermination de l'âge (Desta., 2009).

Nbr des incisives permanentes	Tranche d'âge estimée
0 paire	Moins de 1 an
1 paire	1 ½ an
2 paires	1½ - 2 ans
3 paires	2½ - 3 ans
4 paires	> trois ans
Bouche brisée	Âgés

I.2.2 Méthode de récolte du sperme épiddymaire chez le bouc

Les testicules ont été recueillis de l'abattoir, 1 h 30 m en moyenne après l'abattage et transportés au laboratoire dans les conditions expérimentales. Les testicules de 40 mâles pubères (80 testicules au total) collectés ont été divisés en deux groupes : la moitié des 40 paires de testicules (40 testicules) ont été transportées au laboratoire à température ambiante (E), tandis que l'autre moitié (40 testicules) à ltempérature de réfrigération (R) de 4°C. Dans les deux groupes (E) et (R), un testicule de chaque paire a été traité après abattage, formant les groupes de contrôle (0E et 0R).

Le testicule controlatéral a été traité après 24 heures (T24E, n=6 ; T24R, n=6), 48 heures (T48E, n=6 ; T48R, n=7) et 72 heures (T72E, n=7 ; T72R, n=8) de stockage, à la température correspondante. Le sperme a été recueilli par la méthode de rinçage rétrograde tel que rapporté par Martinez Pastor *et al.* (2006) et Benhenia *et al.* (2016).

Brièvement, l'épididyme et le canal déférent ont été disséqués et séparés du testicule. Les vaisseaux sanguins superficiels ont été coupés et leur contenu enlevé par un rinçage et essuyage. Le sperme a été recueilli dans un microtube en effectuant une coupe à proximité de la jonction du corps et de la partie proximale de la queue de l'épididyme. Ensuite, les canaux déférents ont été cathétérisés avec une aiguille 22G, clampés à l'aide d'une pince, et rincés avec 1 ml de sérum physiologique chauffé à 37 °C suivi d'une injection d'air pour récupérer une quantité maximale de sperme.

Immédiatement après l'extraction, le volume, la concentration du sperme, la motilité, les paramètres cinétiques, le pourcentage des spermatozoïdes anormaux, la viabilité, l'intégrité acrosomiale, et le testHost ont été évalués avant la congélation et après la conservation à court terme au fil du temps (24 h, 48 h et 72 h).

I.2.3 Méthode d'appréciation de la qualité et de la quantité spermatique

Le sperme épидидymaire récolté au laboratoire est maintenu immédiatement au bain sec (figure 40) et examiné sur place pour un examen macroscopique.



Figure 40. Bain sec réglé à 37 °C.

I.2.3.1 Le volume spermatique

Le volume spermatique récolté est apprécié avec la même méthode déjà citée dans la première partie de la thèse.

I.2.3.2 Le nombre de doses

Le nombre de doses de semence pouvant être produites a été calculé en multipliant la concentration de spermatozoïdes du sperme frais par le volume de sperme, puis en divisant le nombre total de spermatozoïdes par 200×10^6 spz/dose. L'examen microscopique nous a permis de déterminer la motilité massale, mobilité progressive, l'intégrité acrosomiale, le test de gonflement hypo-osmotique (hypo-osmotic swelling test = HOST), le pourcentage de spermatozoïdes vivants, le pourcentage de spermatozoïdes anormaux.

I.2.3.3 Évaluation de la mobilité des spermatozoïdes

La mobilité dans ce volet a été évaluée par le système d'analyse de la semence assistée par ordinateur ou systèmes **CASA** (Computer Assisted Semen Analysis). C'est une méthode d'analyse de sperme informatisée qui permet d'obtenir des informations objectives et précises sur la proportion de spermatozoïdes mobiles et leur mouvement. Le système détecte les mouvements des spermatozoïdes et suit chaque spermatozoïde séparément dans le temps et l'espace (figure 41). De nombreux paramètres pouvant être calculés avec cette technique :

- Le pourcentage de spermatozoïdes mobiles (MOT : Total Spermatozoal Motility).
- Le pourcentage de mobilité progressive (PMOT : Progressive Spermatozoal Mobility).
- Le pourcentage de spermatozoïdes fléchissant (dont la trajectoire à des caractéristiques supérieures à une vitesse et une linéarité de mouvement prédéfinie).
- L'amplitude de mouvements latéraux de la tête des spermatozoïdes pendant leur déplacement (ALH : Amplitude of Lateral Head Displacement).
- La vitesse moyenne de déplacement linéaire (VSL : Straight-Line Velocity).
- La vitesse curviligne (VCL : Curvilinear Velocity) c'est-à-dire la vitesse mesurée sur la distance totale parcourue.
- La fréquence des rythmes de croisements des trajectoires (BCF : Beat Cross requency)

La moyenne des déplacements angulaires (MAD : Mean Angular Displacement) (Allimant, 2010 ; Marc, 2015).

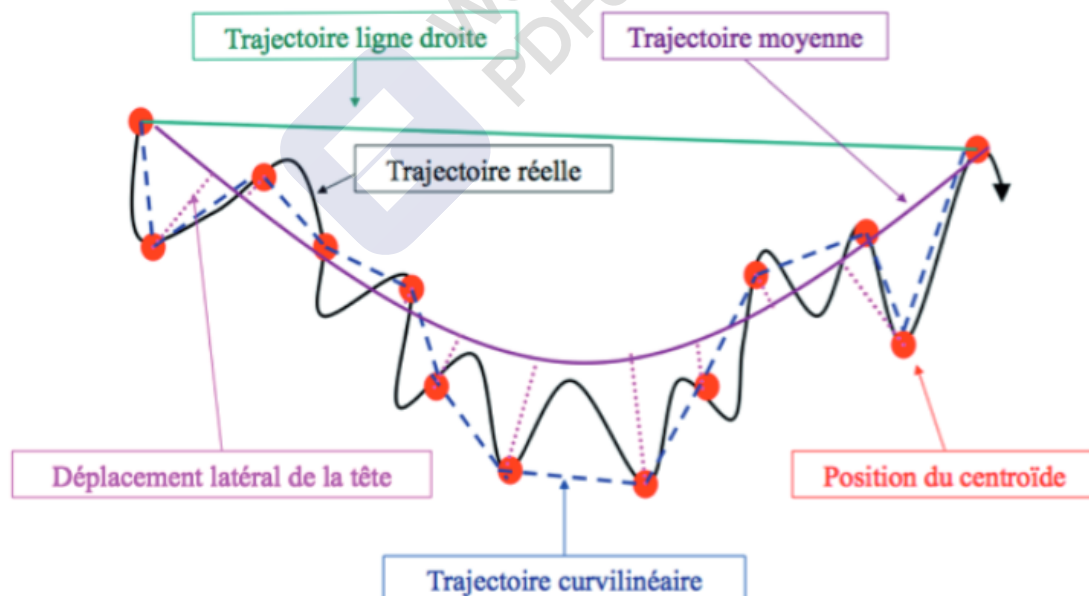


Figure 41. Trajectoires analysées par les analyseurs de sperme assistés par ordinateur (computer assisted semen analyse, CASA) (Ponthier et al., 2014).

Tableau 14. Définitions des trajectoires et des paramètres étudiés par le CASA (Ponthier et al., 2014)

Paramètre	Abréviation	Définition
Vitesse de la trajectoire curvilinéaire	VCL	Vitesse de la trajectoire entre centroïdes dans un intervalle de temps défini
Vitesse de la trajectoire moyenne	VAP	Vitesse de la trajectoire lissée entre n positions du centroïde par intervalle de n temps
Vitesse de la trajectoire en ligne droite	VSL	Vitesse de la trajectoire entre 2 positions du centroïde pris entre n intervalles de temps
Linéarité	LN	VSL/VCL
Rectitude	STR	VSL/VAP
Oscillation	WOB	VAP/VCL

Pour faciliter la capture d'image, les échantillons ont été dilués (10 à 20×10^6 Spz / ml) en utilisant un sérum physiologique. Ensuite, $5 \mu\text{l}$ de chaque échantillon a été placé sur une lame Leja préchauffée à 37°C . La lame a été placée sous un microscope à contraste de phase sur une platine chauffée à 37°C et les images ont été capturées en utilisant une caméra vidéo avec un grossissement $\times 10$. Quatre séquences ont été scannées et au moins 200 spermatozoïdes ont été analysés. Les réglages standards ont été fixés à 25 images/s.

I.2.3.4 Évaluation de l'intégrité acrosomiale

L'intégrité de l'acrosome a été évaluée à l'aide de la coloration bleue de Coomassie G-250 comme décrit par Herrick et al. (2005) et modifié par Benhenia et al. (2018). En bref :

- $100 \mu\text{l}$ de solution de fixation (7,5% de formaldéhyde dans une solution saline tamponnée au phosphate) a été ajouté à $100 \mu\text{l}$ de sperme,
- Après 10 min, l'échantillon a été centrifugé pendant 2 min à $10\,000\text{ g}$ et le surnageant a été jeté,
- Après une deuxième centrifugation, le culot de spermatozoïdes a été lavé deux fois en utilisant 1 ml d'acétate d'ammonium ($\text{pH} = 9$),
- Le sperme a été ensuite suspendu dans $0,5\text{ ml}$ en utilisant la même solution tampon.
- La suspension de spermatozoïdes ($20 \mu\text{l}$) a été étalée sur une lame, séchée à l'air et colorée avec 0,04% (p/v) de bleu de Coomassie G-250 à 3,5% (v/v) d'acide perchlorique pendant 10 minutes,
- Deux rinçages ont été effectués avec de l'eau jusqu'à ce que la couleur bleue apparaisse,
- Pour calculer le pourcentage de spermatozoïdes avec un acrosome intact, au moins 200 spermatozoïdes ont été évalués. Les acrosomes avec une couleur bleu foncé sont considérés comme intacts, tandis que les autres sont considérés comme endommagés.

I.2.3.5 Le test hypo-osmotique (testHost)

La membrane plasmique, composée de lipides, protéines et carbohydrates, crée une enveloppe semi-perméable autour du spermatozoïde et intervient dans la régulation des fonctions spermatiques de par la création d'un gradient ionique. De ce fait, l'évaluation de son intégrité semble être une composante importante de l'évaluation de la semence.

Le testHOST, consiste à exposer le spermatozoïde à une solution hypo-osmotique pour tester la fonction d'osmorégulation (Cabannes, 2008 ; Oliveira *et al.*, 2010). Une membrane intacte doit en effet théoriquement permettre une entrée d'eau excessive dans le cytosol et résulter en un gonflement cytosolique.

Lorsqu'un spermatozoïde fonctionnel est exposé à cette solution hypo-osmotique, son cytosol va ainsi se gonfler pour rétablir l'équilibre osmotique, principalement au niveau de la queue (figure 42) (Cabannes, 2008 ; Oliveira *et al.*, 2010). Inversement, le spermatozoïde incompetent dans son osmorégulation ne montre pas de changements visibles au niveau de son flagelle.

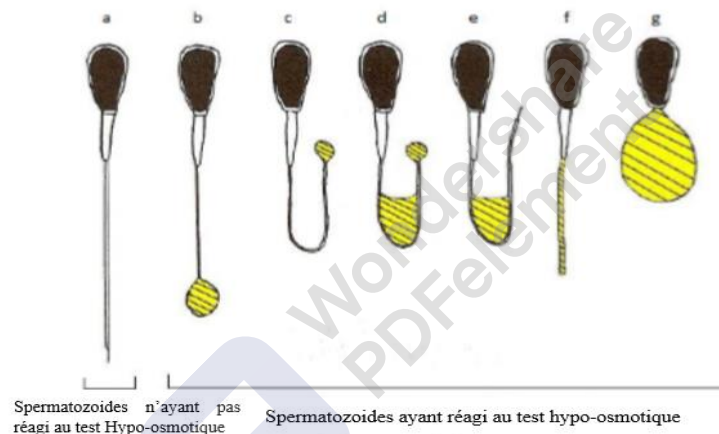


Figure 42. Représentation schématique des changements morphologiques typiques des spermatozoïdes soumis à un stress hypo-osmotique = pas de changement (cellule ayant une membrane plasmique altérée) b-g = divers types de changements (gonflement et enroulement) de la queue des spermatozoïdes (cellules ayant une membrane plasmique intacte). (Cabannes, 2008 ; Allimant, 2010 ; Marc, 2015).

L'intégrité fonctionnelle de la membrane du sperme a été évaluée en utilisant le testHost. En bref, 20 µl de sperme a été mis en incubation avec 200 µl de solution hypo-osmotique (pression osmotique ~ 100 mOsm/kg) pendant 60 min. La solution hypo-osmotique est préparée en mélangeant 9 g de fructose et 4,9 g de citrate de sodium dilués dans 1 litre d'eau distillée à 37 °C. Après l'incubation, 10 µl du mélange (semence, solution) sont mis entre lame et lamelle puis placés sous microscope optique à grossissement ×40.

Au moins, 150 spermatozoïdes ont été évalués. Les spermatozoïdes possédant une queue enroulée gonflée ont été supposés avoir la membrane fonctionnelle (Bucak *et al.*, 2009 ; Sarsaifi *et al.* ; Vichas *et al.*, 2017).

I.2.3.6 La viabilité et le pourcentage de spermatozoïdes anormaux

La viabilité et les anomalies des spermatozoïdes ont été évaluées par la coloration éosine-nigrosine. Les proportions de spermatozoïdes vivants et anormaux ont ensuite été évaluées sous un grossissement $\times 100$ avec de l'huile à immersion, à l'aide d'un microscope à contraste de phase, 200 spermatozoïdes ont été comptés (figure 43) (Evans et Maxwell, 1987 ; Benhania *et al.*, 2018). La lecture des lames est la même décrite dans la première partie de la thèse.

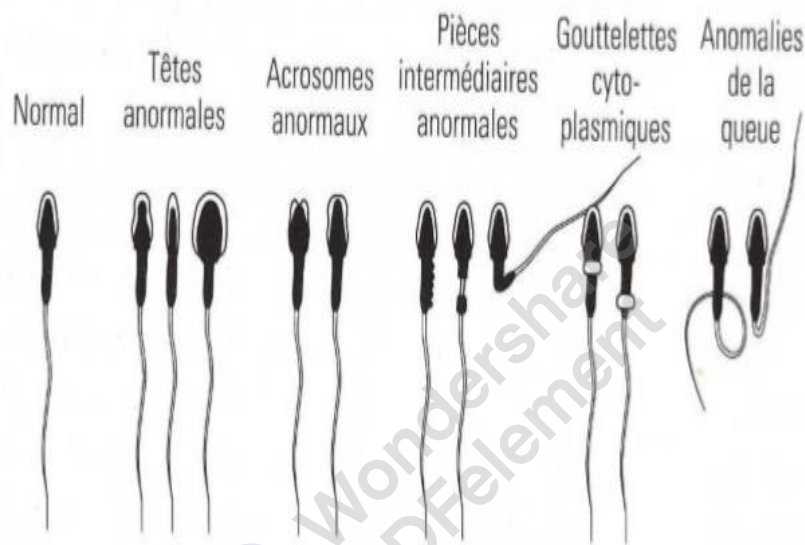


Figure 43. Représentation schématique des anomalies des spermatozoïdes (Allimant, 2010).

I.2.4 La congélation du sperme épидидymaire chez le bouc

I.2.4.1 La dilution

Les diluants de la semence utilisés pour la cryoconservation permettent la protection des spermatozoïdes contre les chocs thermiques et les phénomènes de cristallisation. De plus, les diluants sont une source d'énergie pour les cellules et permettent le maintien d'un milieu de survie temporaire pour les spermatozoïdes (Purdy, 2006).

Pour la préparation du milieu de dilution, il nous faut certains produits chimiques et une balance de précision. Avant de diluer la semence, il faut tout d'abord mesurer l'osmolarité du diluant (fraction) avec un Osmomètre (utilisé des diluants de semence de boucs qui provoque moins de dommages cellulaires se situant entre 425 et 525 mOsm) et un pH-mètre (7.4 – 7.8) (Marc, 2015).

Après la collecte, les échantillons de sperme épидидymaire ont été dilués selon Geneviève (2012) et Benhania *et al.* (2016) avec quelques modifications.

I.2.4.1.1 Composition du milieu de dilution

- **Glycérol** : Ce cryoprotecteur se comporte comme un soluté dans l'eau et il traverse les membranes plasmiques. Le glycérol joue un rôle au niveau des protéines qu'il protège contre la dénaturation au cours des changements de température.
- **Jaune d'œuf** : Le jaune d'œuf contient des phospholipides tels que la lécithine protégeant les membranes des spermatozoïdes contre le choc thermique en restaurant les phospholipides membranaires altérés.
- **Tris (hydroxyméthylaminométhane)** : Le métabolisme des spermatozoïdes entraîne une augmentation de la production des ions d'hydrogène à l'origine d'une acidification du milieu. En l'absence de la solution tampon, la diminution du pH peut entraîner une diminution de la fertilité et de la longévité des spermatozoïdes.
- **Fructose** : C'est un sucre représentant l'apport énergétique des spermatozoïdes. Il possède également un pouvoir osmotique.
- **Acide citrique** : Substance tampon associée avec le Tris.
- **Gentamicine** : C'est un antibiotique qui a pour but de lutter contre la prolifération des bactéries dans le milieu de congélation.

Tableau 15. Composition du diluant (Geneviève, 2012 ; Benhenia et al., 2016)

Glycérol	10% (v/v)
Jaune d'œuf	20% (v/v)
Tris (hydroxyméthylaminométhane)	3,06 g
Fructose	1,25 g
Acide citrique	1,70 g
Gentamicine	27,5 mg
100 ml d'eau distillée	

I.2.4.1.2 Le taux de dilution ou la concentration finale en spermatozoïdes

La dilution permet d'obtenir une concentration en spermatozoïdes optimale pour la congélation. La concentration finale en spermatozoïdes dans l'échantillon dépend du choix du taux de dilution. La concentration finale chez les caprins est de 200×10^6 spz/ ml (la dilution dépend de la concentration et du volume initial).

I.2.4.2 L'équilibration

L'étape d'équilibration correspond à une réfrigération préalable de la semence à 4°C avant la congélation proprement dite. Certains auteurs rapportent que cette étape permettrait aux cryoprotecteurs, notamment le glycérol, de pénétrer dans la cellule.

Silva et al. (2006) et Okano et al. (2004) suggèrent que l'étape d'équilibration permettrait des remaniements membranaires ainsi que le passage membranaire d'ions, à l'origine d'une meilleure résistance à la congélation. Le temps d'équilibration couramment utilisé varie entre 1 et 3 heures (**Gérard et al. 2008**). Dans notre expérimentation, la durée d'équilibration est de 2 h à 4°C.

I.2.4.3 Le conditionnement

Quelle que soit l'espèce, la semence est conditionnée juste avant d'être congelée. Le but du conditionnement est de fractionner la semence de façon à ce qu'elle soit facilement identifiable, stockable et utilisable. Le sperme est généralement stocké en paillettes qui sont de fins tubes en chlorure de polyvinyle, obstrués à une de leurs extrémités par une pièce de coton. L'autre bout est libre, et servira au remplissage de la paillette dont la contenance est de 0,25 ml (figure 44). Les paillettes sont remplies par aspiration et l'autre extrémité s'obstrue en la trompant dans de l'alcool polyvinylique. Une fois remplies, une légère agitation des paillettes permettra de ménager une place pour l'obturation de la bulle d'air nécessaire pour permettre la dilution du sperme lors de la congélation.



Figure 44. Schéma d'une paillette (CASSOU) (Marc, 2015).

Les paillettes sont identifiées à l'aide du nom de l'espèce, du code déterminé pour chaque individu, de la date de récolte et le lieu de récolte (figure 45).



Figure 45. Identification des paillettes avant la congélation

I.2.4.4 La congélation

La congélation consiste à mettre les paillettes conditionnées de 0,25 ml en suspension horizontale à 4 cm au-dessus de l'azote liquide pendant 12 min (étape de calibration), puis, les immerger complètement dans de l'azote liquide à -196 °C et les stocker dans les containers.

I.2.5 La décongélation du sperme épидidymaire

La semence est décongelée juste avant son utilisation, la décongélation s'effectue de manière semblable à l'aide d'un bain-marie (figure 46). Après 5 mois de stockage cryogénique deux paillettes de chaque aliquote ont été décongelées à 37°C pendant 2 min.

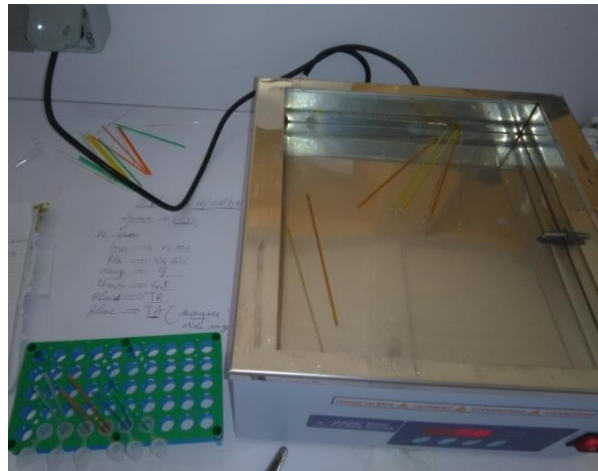


Figure 46. Décongélation des paillettes

I.2.6 Étude statistique de l'effet du temps et de la température sur la qualité du sperme épидидymaire chez le bouc

Les données de la qualité spermatique (sperme épидидymaire) chez le bouc ont été traitées en utilisant les statistiques descriptives, à savoir les valeurs pour les variables quantitatives (type continu).

Pour étudier l'effet de la température ambiante (21.5 °C), de la réfrigération (4 °C), et de la décongélation sur la qualité spermatique chez le bouc (le volume, la concentration, nombre de doses, la motilité massale, la mobilité progressive, les paramètres cinétiques, le testHost, l'intégrité acrosomiale, la viabilité et le pourcentage de spermatozoïdes anormaux) en post mortem selon le temps (24 h, 48 h et 72 h), une analyse de variance à un seul facteur a été effectuée.

L'analyse descriptive de ces critères du sperme épидидymaire a été présentée. Toutes ces données ont été analysées à l'aide du logiciel d'analyse statistique SPSS (version 19).

II. Résultats

Le sperme épидидymaire a été recueilli avec succès de tous les testicules récoltés. Les effets du temps post-mortem (PMT) sur les indices variables de la production du sperme sont présentés dans les tableaux 16 et 17. Les effets de la température de stockage des testicules (TEMP) et du temps post-mortem (PMT) sur la motilité massale, mobilité progressive, les paramètres cinétiques, la viabilité des spermatozoïdes, l'intégrité acrosomiale, le test de gonflement hypo-osmotique (testHost), et le pourcentage de spermatozoïdes anormaux, sur la qualité avant congélation et après congélation du sperme épидидymaires sont indiqués, respectivement, dans les tableaux 18 et 19.

II.1 La production de spermatozoïdes

L'analyse descriptive et de variance de la production de sperme épидидymaire chez le bouc de la population locale au fil du temps (24 h, 48 h et 72 h) du volume, la concentration spermatique et le nombre de doses produites est présentée dans les tableaux 16,17.

Tableau 16. Analyse descriptive de la production de spermatozoïde.

	Moy	Écart type	Erreur std	Var	Min	Max
Vol (ml)	2,21	0,66	0,19	0,44	1,25	3,50
Conc (x10 ⁶ /ml)	3,88	1,18	0,34	1,40	1,75	5,70
Dose (n)	20,16	12,60	3,64	158,80	4,57	45,00

Vol : Volume ; Conc : Concentration ; n = Nombre de paillettes

Tableau 17. Analyse de la variance de la production de sperme épидидymaire en fonction du temps post-mortem.

Paramètres	T0 (N = 40)	T24 (N = 12)	T48 (N = 13)	T72 (N=15)	P
Vol. (ml)	2,42 ± 0,52	2,67 ± 0,72	2,17 ± 0,72	1,58 ± 0,38	Ns
Conc. (10 ⁹ / ml)	4,43a ± 0,61	4,90a ± 0,85	3,93a ± 0,40	2,25 b ± 0,66	**
Dose (n)	21,72ab ± 7,57	34,30 b ± 14,34	17,10 b ± 6,14	7,52 b ± 3,94	*

Vol : Volume collecté ; Conc : Concentration ; T : Temps de stockage des testicules ; n = Nombre de paillettes ; **p<0,01 ; *p<0,05 ; ns=non –signifiant.

II.2 Résultat de l'effet de la température et le temps de conservation des gonades chez le bouc avant la congélation

II.2.1 Analyse descriptive de l'effet de la température ambiante (21.5 °C) de stockage des testicules

Les moyennes, les écarts types, les minima, les maxima et coefficients de variation des valeurs de la qualité spermatique : La motilité massale, la mobilité progressive, les paramètres cinétiques, la viabilité, le test Host, l'intégrité acrosomiale et le pourcentage des spermatozoïdes anormaux sont présentés dans les tableaux 18, 19, 20 et 21.

Tableau 18. Analyse descriptive de la qualité spermatique de gonades conservées à 21.5 °C avant congélation.

	Moy	Écart type	Erreur std	Var	Min	Max
MM (%)	73,12	24,21	6,99	586,21	34,90	99,00
PM (%)	27,77	3,30	0,95	10,90	21,50	31,00
VCL (µm/s)	95,34	28,82	8,32	830,74	65,90	139,20
VSL (µm/s)	62,46	10,07	2,91	101,50	46,00	73,00
VAP (µm/s)	63,69	20,24	5,84	409,69	35,80	91,00
LIN (µm/s)	62,33	11,48	3,31	131,72	49,00	79,00
STR (µm/s)	78,97	8,01	2,31	64,15	69,00	92,00
WOB (µm/s)	75,07	8,13	2,35	66,06	64,00	87,70
ALH (µm/s)	1,93	0,64	0,19	0,42	1,00	3,00
BCF (Hz)	3,13	0,92	0,27	0,85	1,30	5,00
% Spz vivants	70,32	19,34	5,58	374,09	39,70	92,70
% HOST	65,88	14,84	4,28	220,26	46,60	87,50
%Int Acr	73,20	16,79	4,85	281,84	51,20	98,40
%Spz anormaux	2,89	0,70	0,20	0,48	1,70	4,00

MM : motilité massale ; % Spz : pourcentage de spermatozoïdes ; PM : mobilité progressive ; VAP : vitesse de la trajectoire moyenne ; VCL : vitesse curviligne ; VSL : vitesse linéaire ; LIN : linéarité ; STR : rectitude ; BCF : fréquence de battement ; ALH : amplitude du déplacement latéral de la tête ; Int Acr : Acrosome Intact.

II.2.2 Analyse de variance des paramètres spermatiques des gonades conservées à 21.5 °C et à différents temps

II.2.2.1 L'analyse de la variance de l'effet du PMT, du TEMP sur la motilité, mobilité progressive et les paramètres cinétiques des spermatozoïdes avant congélation

L'analyse de variance des paramètres spermatiques sur des échantillons de bouc conservés à 21.5 °C et à différents temps est présenté. Les paramètres analysés sont reportés au tableau 19.

Tableau 19. L'analyse de la variance de l'effet du PMT, du TEMP sur la motilité, mobilité progressive et les paramètres cinétiques des spermatozoïdes avant congélation

PMT	0h	24h	48 h	72 h	p
Tes	20	6	6	7	
MM (%)	98,33 ^a ±0,58	80,55 ^b ±0,75	78,30 ^c ±0,85	35,30 ^d ±0,61	***
PM (%)	29,50 ^a ±0,50	29,00 ^a ±0,50	30,10 ^a ±0,85	22,47 ^b ±1,27	***
VCL (µm/s)	138,43 ^a ±0,80	99,40 ^b ±0,53	77,23 ^c ±0,87	66,30 ^d ±0,61	***
VSL (µm/s)	69,43 ^a ±0,51	71,83 ^b ±1,26	61,30 ^c ±1,18	47,27 ^d ±1,42	***
VAP (µm/s)	90,63 ^a ±0,32	60,57 ^b ±0,81	67,30 ^c ±0,98	36,27 ^d ±0,64	***
LIN (µm/s)	49,57 ^d ±0,60	66,20 ^b ±1,11	78,27 ^a ±0,75	55,30 ^c ±0,61	***
STR (µm/s)	76,20 ^c ±0,75	78,23 ^b ±0,75	91,17 ^a ±0,76	70,27 ^d ±1,42	***
WOB (µm/s)	65,07 ^d ±1,01	76,50 ^b ±0,66	86,43 ^a ±1,12	72,27 ^c ±1,42	***
ALH (µm/s)	2,05 ^a ±0,33	2,17 ^a ±0,29	1,02 ^b ±0,03	2,50 ^a ±0,50	**
BCF (Hz)	2,90 ^b ±0,44	3,07 ^b ±0,12	2,23 ^b ±0,86	4,30 ^a ±0,61	ns

PMT : temps post-mortem ; Tes : nombre de testicule ; MM : motilité massale ; PM : mobilité progressive ; VAP : vitesse de la trajectoire moyenne ; VCL : vitesse curviligne ; VSL : vitesse linéaire ; LIN : linéarité ; STR := rectitude ; BCF : fréquence de battement ; ALH : amplitude du déplacement latéral de la tête ; *** $p < 0,001$ ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$; ns = non -signifiant

II.2.2.2. L'analyse de la variance de l'effet du PMT, du TEMP sur la viabilité, le test Host, l'intégrité acrosomiale et le pourcentage des spermatozoïdes anormaux des spermatozoïdes avant congélation

Le tableau 20 rapporte les valeurs de l'analyse de variance des paramètres comme la viabilité, le TestHost, l'intégrité acrosomiale et le pourcentage des spermatozoïdes anormaux en fonction du temps de conservation post-mortem des testicules de bouc, et ce, à une température ambiante (21.5 °C).

Tableau 20. Analyse de la variance de l'effet du PMT, du TEMP sur la viabilité, le test Host, l'intégrité acrosomiale et le pourcentage des spermatozoïdes anormaux avant congélation

PMT	0h	24h	48 h	72 h	p
Tes	20	6	6	7	
% Spz vivants	90,57 ^a ±2,38	76,13 ^b ±1,21	74,33 ^b ±1,53	40,23 ^c ±0,68	***
% HOST	86,90 ^a ±0,79	67,07 ^b ±0,90	62,33 ^c ±1,53	47,20 ^d ±0,72	***
% Int Acro	97,13 ^a ±1,86	73,50 ^b ±1,20	70,10 ^c ±0,85	52,07 ^d ±0,90	***
% Spz anormaux	2,40±0,53	2,47±0,75	3,33±0,58	3,37±0,47	ns

PMT : temps post-mortem ; Tes : nombre de testicules ; % Spz : pourcentage des spermatozoïdes ; Int Acro : Intact Acrosome ; *** $p < 0,001$ ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$; ns = non -signifiant.

II.2.3 Analyse descriptive de l'effet du stockage des testicules à 4 °C avant congélation

Le tableau suivant présente, les moyennes, les écarts-types, les minima, les maxima et coefficients de variation des valeurs de la qualité spermatique : La motilité massale, la mobilité progressive, les paramètres cinétiques, la Viabilité, le TestHost, l'intégrité acrosomiale et le pourcentage des spermatozoïdes anormaux.

Tableau 21. Analyse descriptive de la qualité spermatique de gonades conservées à 4 °C.

	Moy	Écart type	Erreur std	Var	Min	Max
MM (%)	85,17	17,32	5,77	300,08	61,50	99,30
PM (%)	31,89	5,59	1,86	31,22	26,70	40,50
VCL (µm/s)	89,98	21,37	7,12	456,71	66,60	117,50
VSL ((µm/s)	54,20	12,88	4,29	165,92	43,50	72,00
VAP (µm/s)	58,17	21,46	7,15	460,56	29,60	78,20
LIN (µm/s)	56,62	18,85	6,28	355,23	40,50	82,80
STR (µm/s)	74,67	13,33	4,44	177,69	63,00	93,40
WOB (µm/s)	71,24	13,20	4,40	174,34	58,50	89,80
ALH (µm/s)	1,76	0,61	0,20	0,37	1,00	3,00
BCF (Hz)	3,46	0,78	0,26	0,62	2,50	5,00
% Spz vivants	69,60	19,79	6,60	391,61	42,70	84,00
%HOST	65,86	8,42	2,81	70,94	54,70	75,00
%Int Acr	82,84	11,31	3,77	127,83	68,60	96,00
%Spz anormaux	2,66	0,74	0,25	0,55	1,50	4,00

MM : motilité massale ; PM : mobilité progressive ; %Spz : pourcentage des spermatozoïdes ; VAP : vitesse de la trajectoire moyenne ; VCL : vitesse curviligne ; VSL : vitesse linéaire ; LIN : linéarité ; STR : rectitude ; BCF : fréquence de battement ; ALH : amplitude du déplacement latéral de la tête ; %Spz pourcentage des spermatozoïdes ; Int Acr : Intacte acrosome.

II.2.4 Analyse de variance des paramètres spermatiques des gonades conservées à 4 °C et à différents temps

II.2.4.1 L'analyse de la variance de l'effet du PMT, du TEMP sur la motilité, mobilité progressive et les paramètres cinétiques des spermatozoïdes avant congélation

Les résultats de l'analyse de variance de la motilité massale, de la mobilité progressive et de tous les paramètres cinétiques du sperme épидидymaire, selon le temps de stockage post-mortem (0h, 24h, 48 h, 72 h) des gonades de bouc de la population locale récoltées, de l'est de l'Algérie sont démontrées dans les tableaux 22 et 23.

Tableau 22. Analyse de la variance de l'effet du PMT, du TEMP sur la motilité, mobilité progressive et les paramètres cinétiques des spermatozoïdes épидидymaires avant congélation

PMT	0h	24h	48 h	72 h	p
Tes	20	6	7	8	
MM (%)	98,73a ± 0,98	98,23a±0,97	95,10 b±1,05	62,17c±0,76	***
PM (%)	29,80a ± 0,70	29,27 b±0,75	39,17a±1,26	27,23c±0,68	***
VCL (µm/s)	139,43a ± 0,90	116,17a±1,26	86,57 b±0,51	67,20c±0,72	***
VSL (µm/s)	69,73a ± 0,62	47,17 b±0,76	71,27a±0,64	44,17c±0,76	***
VAP (µm/s)	90,43a ± 0,32	67,07 b±1,90	77,23a±0,87	30,20c±0,72	***
LIN (µm/s)	49,59 d ± 0,63	41,27c±0,93	81,50a±1,14	47,10 b±0,85	***
STR (µm/s)	76,50c ± 0,75	68,27 b±0,87	92,20a±1,11	63,53c±0,50	***
WOB (µm/s)	65,15 d ± 1,01	59,17c±0,76	88,33a±1,33	66,23 b±0,68	***
ALH (µm/s)	2,15a ± 0,23	1,90±0,17	1,17±0,29	2,20±0,72	ns
BCF (Hz)	2,90 b ± 0,43	3,00±0,50	3,17±0,65	4,20±0,72	ns

PMT : temps post-mortem ; Tes : nombre de testicules ; MM : motilité massale ; PM : mobilité progressive ; VAP : vitesse de la trajectoire moyenne ; VCL : vitesse curviligne ; VSL : vitesse linéaire ; LIN : linéarité ; STR : rectitude ; BCF : fréquence de battement ; ALH : amplitude du déplacement latéral de la tête ; *** $p < 0,001$ ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$; ns = non –signifiant.

II.2.4.2 L'analyse de la variance de l'effet du PMT, du TEMP sur la viabilité, le test Host, l'intégrité acrosomiale et le pourcentage des spermatozoïdes anormaux avant congélation

Tableau 23. Analyse de la variance de l'effet du PMT, du TEMP sur la viabilité, le test Host, l'intégrité acrosomiale et le pourcentage des spermatozoïdes anormaux avant congélation

PMT	0h	24h	48 h	72 h	p
Tes	20	6	7	8	
% Spz vivants	91.6a±2.4	83,17a±0,76	82,40a±0,87	43,23 b±0,68	***
% HOST	87.00a±0.8	74,23a±0,68	68,10 b±0,85	55,23c±0,68	***
%Int Acr	97.20±a1.8	95,17a±0,76	84,17 b±0,76	69,20c±0,72	***
%Spz anormaux	2.4±0.5	2,17±0,76	2,58±0,52	3,23±0,68	ns

PMT : temps post-mortem ; Tes : nombre de testicules ; Spz : Spermatozoïdes ; Int Acr : Intact Acrosome *** $p < 0,001$ ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$; ns = non –signifiant.

II.2.5 Analyse de la variance des paramètres spermatique selon le temps (PMT) et la température de conservation des gonades avant congélation

Le tableau 24 présente les valeurs de l'analyse de variance de la motilité massale, la mobilité progressive, les paramètres cinétiques (VSL, VCL, VAP, LIN, STR, WOB, ALH, BCF), le pourcentage des spermatozoïdes vivants, le test HOST, le pourcentage des spermatozoïdes avec un acrosome intact et le pourcentage des spermatozoïdes avec anomalies, du sperme épидидymaire récolté des testicules de bouc local et conservés à une température ambiante (21.5°C) et à une température de réfrigération (4°C) pendant 0 h, 24 h, 48 h et 72 h avant congélation.

Tableau 24. Analyse de variance des paramètres spermatique selon PMT et TEMP avant congélation.

Paramètres	T	E (20.5 °C)	R (4 °C)	P
MM (%)	24h	80,55±0,75	98,23±0,97	<0.001
	48 h	78,30±0,85	95,10±1,05	<0.001
	72 h	35,30±0,61	62,17±0,76	<0.001
PM (%)	24h	29,00±0,50	29,27±0,75	ns
	48 h	30,10±0,85	39,17±1,26	<0.001
	72 h	22,47±1,27	27,23±0,68	<0.01
VCL (µm/s)	24h	99,40±0,53	116,17±1,26	<0.001
	48 h	77,23±0,87	86,57±0,51	<0.001
	72 h	66,30±0,61	67,20±0,72	Ns
VSL (µm/s)	24h	71,83±1,26	47,17±0,76	<0.001
	48 h	61,30±1,18	71,27±0,64	<0.001
	72 h	47,27±1,42	44,17±0,76	<0.05
VAP (µm/s)	24h	60,57±0,81	67,07±1,90	<0.01
	48 h	67,30±0,98	77,23±0,87	<0.001
	72 h	36,27±0,64	30,20±0,72	<0.001
LIN (µm/s)	24h	66,20±1,11	41,27±0,93	<0.001
	48h	78,27±0,75	81,50±1,14	<0.05
	72h	55,30±0,61	47,10±0,85	<0.001
STR (µm/s)	0h	76,20c±0,75		
	24h	78,23±0,75	68,27±0,87	<0.001
	48h	91,17±0,76	92,20±1,11	Ns
	72h	70,27±1,42	63,53±0,50	<0.01
WOB (µm/s)	24h	76,50±0,66	59,17±0,76	<0.001
	48h	86,43±1,12	88,33±1,33	Ns

	72h	72,27±1,42	66,23±0,68	<0.01
ALH (µm/s)	24h	2,17±0,29	1,90±0,17	Ns
	48h	1,02±0,03	1,17±0,29	Ns
	72h	2,50±0,50	2,20±0,72	Ns
BCF (µm/s)	24h	3,07±0,12	3,00±0,50	Ns
	48h	2,23±0,86	3,17±0,65	Ns
	72 h	4,30±0,61	4,20±0,72	Ns
% Viab	24h	76,13±1,21	83,17±0,76	<0.01
	48 h	74,33±1,53	82,40±0,87	<0.01
	72 h	40,23±0,68	43,23±0,68	<0.01
% HOST	24h	67,07±0,90	74,23±0,68	<0.001
	48 h	62,33±1,53	68,10±0,85	<0.01
	72 h	47,20±0,72	55,23±0,68	<0.001
% In Acro	24h	73,50±1,20	95,17±0,76	<0.001
	48 h	70,10±0,85	84,17±0,76	<0.001
	72 h	52,07±0,90	69,20±0,72	<0.001
% Spz anormaux	24h	2,47±0,75	2,17±0,76	ns
	48 h	3,33±0,58	2,58±0,52	ns
	72 h	3,37±0,47	3,23±0,68	ns

MM : motilité massale ; %Spz : pourcentage des spermatozoïdes ; PM : mobilité progressive ; VAP : vitesse de la trajectoire moyenne ; VCL : vitesse curviligne ; VSL : vitesse linéaire ; LIN : linéarité ; STR : rectitude ; BCF : fréquence de battement ; ALH : amplitude du déplacement latéral de la tête ; % Viab : pourcentage des spermatozoïdes vivants, Int Acr : Intact Acrosome

II.3 Résultats de l'effet du temps et de la température post mortem sur les paramètres spermatiques après congélation.

II.3.1 Analyse descriptive de l'effet de stockage des testicules à 21.5 °C sur les paramètres spermatiques après congélation

Tableau 25. Analyse descriptive de la qualité spermatique des gonades conservées à 21.5 °C après congélation.

	Moy	Écart type	Erreur std	Var	Min	Max
MM (%)	43,23	5,82	1,68	33,85	33,80	51,20
PM (%)	22,18	1,64	0,47	2,70	19,70	25,00
VCL (µm/s)	81,51	13,31	3,84	177,27	65,70	100,00
VSL ((µm/s)	60,52	9,29	2,68	86,30	46,60	73,00
VAP (µm/s)	54,74	11,38	3,29	129,59	35,70	65,00
LIN (µm/s)	65,01	6,07	1,75	36,81	54,80	71,10
STR (µm/s)	77,73	4,75	1,37	22,61	69,50	83,10
WOB (µm/s)	75,51	3,03	0,88	9,20	71,83	80,00
ALH (µm/s)	1,97	0,76	0,22	0,58	1,00	3,20
BCF (Hz)	3,55	1,13	0,33	1,29	1,30	5,20
% Spz vivants	42,98	3,41	0,98	11,62	38,40	49,00
% HOST	49,79	6,02	1,74	36,29	39,83	55,80
%Int Acr	63,79	11,13	3,21	123,84	47,83	79,00
%Spz anormaux	2,74	0,82	0,24	0,67	1,70	4,23

MM : motilité massale ; %Spz : pourcentage des spermatozoïdes ; PM : mobilité progressive ; VAP : vitesse de la trajectoire moyenne ; VCL : vitesse curviligne ; VSL : vitesse linéaire ; LIN : linéarité ; STR : rectitude ; BCF : fréquence de battement ; ALH : amplitude du déplacement latéral de la tête ; Int Acr : Intact Acrosome.

II.3.2 Analyse de la variance de l'effet de PMT et TEMP sur la qualité spermatique après congélation

Nos résultats d'analyse de la variance de l'effet de stockage post-mortem (0 h, 24 h, 48 h, 72 h) des testicules à une température ambiante (21.5 °C) sur la qualité du sperme épидidymaire après congélation sont présentés dans le tableau 26 et 27.

II.3.2.1 L'analyse de la variance de l'effet du PMT, du TEMP sur la motilité, mobilité progressive et les paramètres cinétiques des spermatozoïdes après congélation

Tableau 26. L'analyse de la variance de l'effet du PMT, du TEMP sur la motilité, mobilité progressive et les paramètres cinétiques des spermatozoïdes après congélation

PMT	0h	24h	48 h	72 h	P
Tes	20	6	6	7	
MM (%)	45,23 b±0,68	42,27c±0,64	50,33a±0,76	35,07 d±1,30	***
PM (%)	22,23 b±0,68	20,23c±0,68	24,17a±0,76	22,07 b±1,30	**
VCL (µm/s)	99,27a±0,64	87,23 b±0,68	73,31c±0,78	66,23 d±0,68	***
VSL (µm/s)	72,23a±0,68	62,23 b±0,68	60,31c±0,69	47,30 d±0,89	***
VAP (µm/s)	60,23 b±0,68	58,23c±0,68	64,24a±0,67	36,27 d±0,74	***
LIN (µm/s)	66,27c±0,64	68,17 b±0,76	70,30a±0,70	55,31 d±0,72	***
STR (µm/s)	79,23 b±0,68	79,17 b±0,76	82,30a±0,70	70,24c±0,88	***
WOB (µm/s)	77,23 b±0,68	73,27c±0,64	79,27a±0,64	72,28c±0,63	***
ALH (µm/s)	2,30±0,61	2,23±0,68	1,07±0,12	2,27±0,83	Ns
BCF (Hz)	4,27a±0,64	3,50a±0,50	2,10 b±0,85	4,34a±0,90	*

PMT : temps post-mortem ; Tes : nombre de testicules ; MM : motilité massale ; PM : mobilité progressive ; VAP : vitesse de la trajectoire moyenne ; VCL : vitesse curviligne ; VSL : vitesse linéaire ; LIN : linéarité ; STR : rectitude ; BCF : fréquence de battement ; ALH : amplitude du déplacement latéral de la tête ; *** $p < 0,001$ ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$; ns=non –signifiant.

II.3.2.2 L'analyse de la variance de l'effet du PMT, du TEMP sur la viabilité, le test Host, l'intégrité acrosomiale et le pourcentage des spermatozoïdes anormaux après congélation

Tableau 27. L'analyse de la variance de l'effet du PMT, du TEMP sur la viabilité, le test Host, l'intégrité acrosomiale et le pourcentage des spermatozoïdes anormaux après congélation

PMT	0h	24h	48 h	72 h	p
Tes	20	6	6	7	
% Spz vivants	48,27a±0,64	41,23bc±0,68	42,30 b±0,70	40,12c±1,75	***
% HOST	54,30a±0,61	50,20 b±0,72	54,33a±1,33	40,31c±0,61	***
% Intat Acr	78,27a±0,64	63,27c±0,64	65,33 b±0,76	48,28 d±0,63	***
%Spz anormaux	2,27±0,64	2,23±0,68	3,36±0,76	3,11±0,86	ns

PMT : temps post-mortem ; Tes : nombre de testicule ; Spz : Spermatozoïdes ; Int Acr : Intact Acrosome ; *** $p < 0,001$ ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$; ns=non –signifiant.

II.3.3 Analyse descriptive de l'effet de stockage des testicules à 4 °C sur la qualité spermatique après congélation

Les moyennes, les écarts types, les minima, les maxima et les coefficients de variation des valeurs de la motilité massale, la mobilité progressive, les paramètres cinétiques, la viabilité, le test HOST, le pourcentage des spermatozoïdes anormaux et le pourcentage des spermatozoïdes avec un acrosome intact, du sperme épидидymaire récolté des gonades conservées pendant 0h, 24h, 48 h, 72 h à 4 °C sont présentés dans le tableau suivant.

Tableau 28. Analyse descriptive de la qualité spermatique après congélation de gonades à 4 °C.

	Moy	Écart type	Erreur std	Var	Min	Max
MM (%)	45,32	6,34	2,11	40,23	36,97	53,00
PM (%)	23,58	3,23	1,08	10,44	19,46	28,60
VCL (µm/s)	84,29	13,57	4,52	184,27	66,28	99,00
VSL ((µm/s)	57,88	11,75	3,92	138,06	43,60	72,30
VAP (µm/s)	55,61	21,08	7,03	444,30	28,85	78,00
LIN (µm/s)	56,51	18,66	6,22	348,29	40,82	82,00
STR (µm/s)	74,52	13,22	4,41	174,85	63,82	94,00
WOB (µm/s)	72,87	11,44	3,81	130,77	63,82	90,00
ALH (µm/s)	1,96	0,88	0,29	0,77	1,00	3,65
BCF (Hz)	3,20	0,73	0,24	0,53	2,20	4,00
% Spz vivants	43,93	1,12	0,37	1,26	42,80	46,00
% HOST	52,16	5,51	1,84	30,39	44,00	58,00
%Int Acr	60,68	7,76	2,59	60,24	49,83	67,10
%Spz anormaux	2,43	1,09	0,36	1,19	1,00	4,80

MM : motilité massale ; %Spz pourcentage des spermatozoïdes ; PM : mobilité progressive ; VAP : vitesse de la trajectoire moyenne ; VCL : vitesse curviligne ; VSL : vitesse linéaire ; LIN : linéarité ; STR : rectitude ; BCF : fréquence de battement ; ALH : amplitude du déplacement latéral de la tête ; Ant Acr : Acrosome Intact.

II.3.3.1. L'analyse de la variance de l'effet du PMT, du TEMP sur la motilité, mobilité progressive et les paramètres cinétiques des spermatozoïdes après congélation

Tableau 29. L'analyse de la variance de l'effet du PMT, du TEMP sur la motilité, mobilité progressive et les paramètres cinétiques des spermatozoïdes après congélation

PMT	0h	24h	48 h	72 h	P
Tes	20	6	7	8	
MM (%)	45,50 b ± 0,28	46,28 b±0,63	52,07a±1,01	37,60c±0,55	***
PM (%)	23,23 b ± 0,60	20,15c±0,78	27,20a±1,31	23,37 b±1,45	**
VCL (µm/s)	10,07a ± 0,64	98,24a±0,67	87,27 b±0,64	67,37c±1,32	***
VSL (µm/s)	73,20a ± 0,69	57,93 b±0,12	71,40a±0,78	44,30c±0,89	***
VAP (µm/s)	60,50 b ± 0,66	60,27 b±0,64	77,28a±0,63	29,29c±0,64	***
LIN (µm/s)	66,87c ± 0,67	41,27c±0,64	81,12a±0,82	47,13 b±1,80	***
STR (µm/s)	80,20 b ± 0,64	67,27 b±0,64	92,00a±2,00	64,27c±0,64	***
WOB (µm/s)	78,23 b ± 0,78	64,27c±0,64	88,00a±2,00	66,34 b±0,75	***
ALH (µm/s)	2,40± 0,71	2,27±0,64	1,27±0,46	2,35±1,17	Ns
BCF (Hz)	4,25a ± 0,44	3,07±0,90	3,20±0,72	3,35±0,86	Ns

PMT : temps post-mortem ; Tes : nombre des testicules ; PM : mobilité progressive ; VAP : vitesse de la trajectoire moyenne ; VCL : vitesse curviligne ; VSL : vitesse linéaire ; LIN : linéarité ; STR : rectitude ; BCF : fréquence de battement ; ALH : amplitude du déplacement latéral de la tête ; *** $p < 0,001$ ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$; ns=non –signifiant.

II.3.3.2. L'analyse de la variance de l'effet du PMT, du TEMP sur la viabilité, le test Host, l'intégrité acrosomiale et le pourcentage des spermatozoïdes anormaux après congélation

Tableau 30. L'analyse de la variance de l'effet du PMT, du TEMP sur la viabilité, le test Host, l'intégrité acrosomiale et le pourcentage des spermatozoïdes anormaux après congélation

PMT	0h	24h	48 h	72 h	P
Tes	20	6	7	8	
% Spz vivants	49.2a±0.6	43,33 b±0,69	45,20a±0,72	43,27 b±0,64	*
% HOST	54.3a±0.6	54,28 b±0,63	57,13a±0,81	45,07c±1,10	***
%Int Acr	79.06a±0.6	65,35a±0,68	66,30a±0,70	50,38 b±0,80	***
%Spz anormaux	2.5±0.6	2,30±0,66	1,60±0,53	3,40±1,25	Ns

PMT : temps post-mortem ; Tes : nombre des testicules ; Spz : Spermatozoïdes ; Int Acr : Intact Acrosome ; *** $p < 0,001$ ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$; ns=non –signifiant.

II.3.6. Analyse de la variance des paramètres spermatiques selon le temps (PMT) et la température de conservation des gonades après congélation.

Tableau 31. Analyse de variance des paramètres spermatique selon PMT et TEMP après congélation.

Paramètres	T	E (20.5 °C)	R (4 °C)	p
MM (%)	24h	42,27±0,64	46,28±0,63	<0.01
	48 h	50,33±0,76	52,07±1,01	Ns
	72 h	35,07±1,30	37,60±0,55	<0.05
PM(%)	24h	20,23±0,68	20,15±0,78	Ns
	48 h	24,17±0,76	27,20±1,31	<0.05
	72 h	22,07±1,30	23,37±1,45	Ns
VCL (µm/s)	24h	87,23±0,68	98,24±0,67	<0.001
	48 h	73,31±0,78	87,27±0,64	<0.001
	72 h	66,23±0,68	67,37±1,32	Ns
VSL (µm/s)	24h	62,23±0,68	57,93±0,12	<0.001
	48 h	60,31±0,69	71,40±0,78	<0.001
	72 h	47,30±0,89	44,30±0,89	<0.05
VAP (µm/s)	24h	58,23±0,68	60,27±0,64	<0.05
	48 h	64,24±0,67	77,28±0,63	<0.001
	72 h	36,27±0,74	29,29±0,64	<0.001
LIN (µm/s)	24h	68,17±0,76	41,27±0,64	<0.001
	48h	70,30±0,70	81,12±0,82	<0.001
	72h	55,31±0,72	47,13±1,80	<0.01
STR (µm/s)	24h	79,17±0,76	67,27±0,64	<0.001
	48h	82,30±0,70	92,00±2,00	<0.01
	72h	70,24±0,88	64,27±0,64	<0.01
WOB (µm/s)	24h	73,27±0,64	64,27±0,64	<0.001
	48h	79,27±0,64	88,00±2,00	<0.01
	72h	72,28±0,63	66,34±0,75	<0.001
ALH (µm/s)	24h	2,23±0,68	2,27±0,64	Ns
	48h	1,07±0,12	1,27±0,46	Ns
	72h	2,27±0,83	2,35±1,17	Ns
BCF (µm/s)	24h	3,50±0,50	3,07±0,90	Ns
	48h	2,10±0,85	3,20±0,72	Ns
	72 h	4,34±0,90	3,35±0,86	Ns

% Viab	24h	41,23±0,68	43,33±0,69	<0.05
	48 h	42,30±0,70	45,20±0,72	<0.01
	72 h	40,12±1,75	43,27±0,64	<0.05
% HOST	24h	50,20±0,72	54,28±0,63	<0.01
	48 h	54,33±1,33	57,13±0,81	<0.05
	72 h	40,31±0,61	45,07±1,10	<0.01
% In Acro	24h	63,27±0,64	65,35±0,68	<0.05
	48 h	65,33±0,76	66,30±0,70	Ns
	72 h	48,28±0,63	50,38±0,80	<0.05
% Spz anormaux	24h	2,23±0,68	2,30±0,66	ns
	48 h	3,36±0,76	1,60±0,53	<0.05
	72 h	3,11±0,86	3,40±1,25	ns

MM : motilité massale ; %Spz : pourcentage des spermatozoïdes ; PM : mobilité progressive ; VAP : vitesse de la trajectoire moyenne ; VCL : vitesse curviligne ; VSL : vitesse linéaire ; LIN : linéarité ; STR : rectitude ; BCF : fréquence de battement ; ALH : amplitude du déplacement latéral de la tête ; % Viab : pourcentage des spermatozoïdes vivants, Int Acr : Acrosome Intact

III. Discussion

La récolte et la cryoconservation des spermatozoïdes viables de l'épididyme peuvent être un outil alternatif pour collecter les gamètes mâles, en particulier chez les espèces sauvages où une collecte avec vagin artificiel ou par électroéjaculation est difficile en raison du manque de centre de collecte et des experts, comme les populations locales élevées dans des zones rurales, car aucune information n'est disponible dans la littérature sur la dégradation de la qualité du sperme épидидymaire de bouc de population locale algérienne.

Pour les populations animales de rente locales ou autochtones qui sont en voie de déclin en raison de l'introduction incessante de races exotiques performantes, et en présence des croisements utilisés anarchiquement dans l'espoir d'améliorer les performances de nos populations, il est important de trouver comment conserver ces dernières. En effet, les qualités d'adaptabilité de nos races aux conditions locales (résistances aux pathologies présentes au manque d'eau, aux périodes de disette et aux difficultés liées au climat) et malgré leur faible productivité, nous incitent à préserver ce patrimoine génétique de grande valeur qui s'avère être très utile.

En effet, l'histoire nous a enseigné que dans les pays développés qui ont utilisé excessivement les races sélectionnées et très performantes, au détriment des populations moins productives, se sont vus confrontés à des problèmes sanitaires et économiques graves. A cet effet, la conservation du potentiel animal local adapté aux conditions difficiles s'avère urgente, ce qui justifie l'objectif de notre travail visant à la conservation à long terme du matériel génétique de ces espèces. Pour les espèces qui n'ont pas l'habitude d'être récoltées par les moyens de récolte de la semence, une autre alternative peut être employée, celle de l'utilisation du sperme épидидymaire qui offre d'autres avantages.

L'objectif de ce travail était d'évaluer les effets du stockage post-mortem des testicules, en fonction du temps écoulé entre la mort de l'animal et la récupération des spermatozoïdes et de la température de stockage des testicules, pour des échantillons pré congelés et post-congelés, afin de comprendre comment maintenir la qualité du sperme épидидymaire dans les conditions de terrain avant son arrivée aux laboratoires.

III.1 Production du sperme épидидymaire selon le temps post-mortem

Le temps de conservation post mortem à 0 h, 24 h, 48 h et 72 h n'a pas eu d'effet significatif sur le volume du sperme épидидymaire récolté, dont les valeurs respectives aux temps pré-cités sont de : $2,42 \pm 0,52$ ml ; $2,67 \pm 0,72$ ml ; $2,17 \pm 0,72$ ml et $1,58 \pm 0,38$ ml.

En ce qui concerne la concentration des spermatozoïdes, une différence significative ($p < 0,01$) aux temps de conservation suscités est relevée avec les valeurs respectives de : $4,43 \pm 0,61 \times 10^6$ spz/ml ; $4,90 \pm 0,85 \times 10^6$ spz/ml ; $3,93 \pm 0,40 \times 10^6$ spz/ml et $2,25 \pm 0,66 \times 10^6$ spz/ml

De même, le nombre de doses produites aux différents temps étudiés présente une différence significative ($p < 0,05$), avec les valeurs respectives de $21,72 \pm 7,57$; $34,30 \pm 14,34$; $17,10 \pm 6,14$; $7,52 \pm 3,94$. Notons que la concentration la plus faible a été observée à 72 h de stockage des testicules, et par conséquent, un nombre plus faible de doses a été produit pour chaque épидидyme. Pour le volume, les mêmes constatations ont été relevées après 48 h de stockage des testicules.

Il en ressort qu'après 24 h et 48 h de conservation des testicules en post mortem, des difficultés d'extraction des spermatozoïdes de la queue de l'épididyme sont constatées et par conséquent, le nombre de doses de sperme pour chaque épидидyme s'amenuise de 21 doses à T0, jusqu'à 7 doses à T72.

Cela peut s'expliquer par le fait qu'après la mort de l'animal, le tissu du canal déférent et de la queue de l'épididyme subit progressivement un processus de détérioration, de décomposition et de déshydratation. Ce processus est plus marqué dans les échantillons stockés à une température ambiante qui compromet les conditions de manipulation de l'épididyme lors de l'extraction du sperme (Turri *et al.*, 2014).

III.2 Les effets de la température de stockage des testicules (TEMP) et du temps post-mortem (PMT) avant congélation

III.2.1 La motilité massale

Concernant les effets du temps post-mortem (PMT) et de la température de stockage des testicules (TEMP) sur l'évaluation de la motilité massale des échantillons avant congélation, présentés dans le tableau 18. Le PMT et la TEMP ont induit une réduction hautement significative ($P < 0,001$) de la motilité massale à 72 heures de conservation des testicules : $98,33 \pm 0,58$; $80,55 \pm 0,75$ % ; $78,30 \pm 0,85$ % ; $35,30 \pm 0,61$ % (de 0 h à 72 h à température ambiante) ; et de $98,73 \pm 0,98$ % ; $98,23 \pm 0,97$ % ; $95,10 \pm 1,05$; $62,17 \pm 0,76$ % (0 h à 72 h à température de réfrigération respectivement).

Le pourcentage de spermatozoïdes mobiles a diminué d'environ 10-12 % au cours des trois jours de stockage pour les deux températures (température ambiante E, température de réfrigération R). Selon notre étude, les valeurs de la motilité massale obtenue après conservation des gonades à température de réfrigération sont meilleures que celle récupéré après conservation à température ambiante. Les valeurs de la motilité massale du sperme épидидymaire récoltée des gonades de bouc conservées à la température ambiante ou à la température de réfrigération sont excellentes pour une utilisation ultérieure (cryoconservation), jusqu'aux 48 h à 21.5 °C et jusqu'aux 72 h à 4 °C.

Nos résultats sont en accord avec celle de Turri *et al.*(2014), d'où une différence hautement significative a été déterminé entre les différentes valeurs de la motilité massale, selon la température et le temps de conservation des gonades chez le bouc avec des valeurs plus basses que nos résultats. De 0 h à 72 h à température ambiante sont respectivement : 71.3 % ; 67.6 % ; 60.8% ; 25.2% ; alors que de 0 h à 72 h à température de réfrigération sont de 78.3% ; 79.7% ; 73.6% ; 51.8% respectivement.

L'environnement des spermatozoïdes épидидymaires était étonnamment très protecteur, si on considère que la concentration de spermatozoïdes dans la queue de l'épididyme atteint près de 10^{10} spz/ml et qu'une telle concentration de spermatozoïdes devrait être fortement nuisible aux spermatozoïdes dans les diluants de sperme courants (Fernández Abella *et al.*, 2015). La queue de l'épididyme induit la motilité par les sécrétions de l'épithélium due à la sécrétion de la carnitine et des protéines qui régulent la mobilité des spermatozoïdes. Au fil du temps et du stockage des spermatozoïdes, la teneur en carnitine a diminué, ce qui a réduit la mobilité des spermatozoïdes (Ghosh *et al.*, 1993).

Abu AH et al. (2016) ont déterminé chez le bouc (red Sokoto) que la conservation des testicules et de l'épididyme à 5 °C pendant 48 h une diminution significative du pourcentage de spermatozoïdes motile ($p < 0,05$) après 24 h de $69,00 \pm 0,46\%$ à $50,60 \pm 0,48\%$ à 48 h, respectivement, ces résultats sont en accord avec les nôtres, mais avec des valeurs plus basses.

Selon les travaux de **Fernández Abella et al. (2015)** sur l'espèce ovine, la récolte du sperme après conservation de l'épididyme à 4°C pendant 24 h, (après castration), et stockage sans dilution de ce dernier à 4 °C, ils ont pu déterminer une diminution du pourcentage de spermatozoïdes mobiles à 48 h qui était aux environs de 18-20% par jour. Seuls 25% des spermatozoïdes mobiles ont été observés à 72 h. Cette valeur était significativement inférieure que celles observées pour les spermatozoïdes prélevés immédiatement de l'épididyme et conservés pendant 72 h ($45 \pm 6,0\%$ contre $25,7 \pm 5,1$, $p < 0,05$).

Selon **Wachida et al. (2019)**, les échantillons de l'épididyme du bélier, traité immédiatement ou conservés au réfrigérateur à 5°C pendant 6, 12, 24 et 48 h ; ont indiqué que la motilité des spermatozoïdes a diminué d'une façon significative ($P < 0,05$) par rapport au témoin [$87,5 \pm 2,1\%$ (0 h), à $85,0 \pm 1,8\%$ (6 h), $73,3 \pm 3,6\%$ (12 h), $53,3 \pm 2,5\%$ (24 h) et $50,0 \pm 2,9\%$ (48 h)].

La température de réfrigération semble empêcher la dégradation de la qualité du sperme épидидymaire avec le temps, en particulier de la motilité des spermatozoïdes, induisant une réduction du métabolisme des spermatozoïdes en termes de phosphorylation oxydative mitochondriale et d'activités glycolytiques (**Salamon et al., 2000 ; Bergstein-Galan et al., 2017**). Dans ces conditions, la motilité massale diminue jusqu'à 24 h post-mortem. Après 48 h de conservation des testicules, la réfrigération était essentielle pour prévenir la dégradation de la qualité du sperme épидидymaire au fil du temps. Au regard de nos résultats, même pour une courte période, l'épididyme de bouc devrait être transporté à +4°C.

III.2.2 La Mobilité progressive

Selon l'étude statistique de l'effet de la température (ambiante, réfrigération) et du temps de stockage post mortem (0 h, 24 h, 48 h et 72 h) des gonades de bouc sur la mobilité progressive avant la congélation (tableau 18), une différence hautement significative a été observée entre les différentes valeurs analysées. À température ambiante les données de la mobilité progressive sont : $29,50 \pm 0,50\%$; $29,00 \pm 0,50\%$; $30,10 \pm 0,85\%$; $22,47 \pm 1,27\%$. Alors qu'à la température de réfrigération elles sont de : $29,80 \pm 0,70\%$; $29,27 \pm 0,75\%$; $39,17 \pm 1,26\%$; $27,23 \pm 0,68\%$ pendant une durée de conservation comme suit : 0 h, 24 h, 48 h et 72 h respectivement.

Aucune différence significative n'a été observée entre la mobilité progressive ($p > 0,05$), des spermatozoïdes récoltés après conservation des gonades à la température ambiante (E) et à la température de réfrigération (R), pendant 0 h et 24 h. Toutefois, quelle que soit la température de conservation, une réduction significative a été observée à 48 h et 72 h. Par contre, les valeurs de la mobilité progressive restent acceptables jusqu'à 72 h quelle que soit la température de conservation des gonades.

Selon les travaux de **Barbas et al. (2018)**, le seuil de la motilité progressive pour les spermatozoïdes chez le bouc était de 30 $\mu\text{m/s}$ (population de spermatozoïdes se déplaçant vers l'avant avec une vitesse de trajectoire $\geq 30 \mu\text{m/s}$).

Nos résultats sont en accord avec ceux rapportés par **Turri et al. (2014)**, une réduction significative a été observée à 48 h et 72 h à une température ambiante (E). Contrairement à la température de réfrigération (R) qui a induit une augmentation de la motilité massale dans le groupe 48R par rapport au groupe 48E. Le même résultat a été observé par d'autres auteurs chez le bélier à 24 h (**Kaabi et al., 2003**) et le taureau à 48 h du temps post-mortem (**Martinez Pastor et al., 2009**) dans les mêmes conditions d'expérimentation.

Cela signifie que la température et le temps de conservation des gonades chez le bouc influencent la mobilité des spermatozoïdes. D'après nos résultats et même ceux de **Turri et al. (2014)**, la température de réfrigération a un effet positif sur la mobilité des spermatozoïdes. Ces résultats ont été signalés aussi par **Kikuchi et al. (1998)** chez le porc, **Martins et al. (2009)** chez le taureau, et **Muradás et al. (2006)** chez les étalons.

III.2.3 Les paramètres cinétiques

La diminution des paramètres cinétiques est hautement significative ($p < 0,001$) avec le temps post-mortem, mais il n'y avait pas de différence pour certains paramètres comme ALH et BCF ($p > 0,05$). La température de stockage des testicules (TEMP) à un effet hautement significatif ($P < 0,001$), sur presque tous les paramètres sauf : VCL à 72 h (72E vs 72R ; $p > 0,05$), STR et WOB à 48 h (48E vs 48R ; $P > 0,005$), ALH et BCF (0E vs 72E ; 0R vs 72R ; $p > 0,005$). Avec des valeurs meilleures que celle de **Turri et al. (2014)** dans les mêmes conditions expérimentales.

Selon **Barbas et al. (2018)** :

- Le seuil de la vitesse pour les cellules statiques était de 20 $\mu\text{m/s}$ (population de spermatozoïdes immobile qui présente un mouvement avec une VAP $< 20 \mu\text{m/s}$),
- Le seuil de vitesse maximale était de 80 $\mu\text{m/s}$ (les spermatozoïdes étaient considérés comme rapides lorsque la VAP $\geq 80 \mu\text{m/s}$),

Alors que **Tuli et al. (1992)** ; **Farrell et al. (1996)** et **Marco-Jiménez et al. (2005)** ont démontré que les spermatozoïdes sont considérés comme motiles, quand la vitesse curviligne (VCL) est supérieure ou égale à 20 $\mu\text{m/s}$. Tandis que **Bravo et al. (2011)** considèrent les spermatozoïdes d'une motilité rapide quand la VCL $> 75 \mu\text{m/s}$. D'après ces constatations, on peut dire que nos valeurs des paramètres cinétiques sont acceptables jusqu'à 48h, quelle que soit la température de conservation (ambiante et réfrigération).

Selon **Soler et al. (2003)** et **Chatizaa et al. (2012)**, les principaux paramètres cinétiques du sperme : ALH (%), VAP ($\mu\text{m/s}$), VCL ($\mu\text{m/s}$), VSL ($\mu\text{m/s}$), LsIN (%), STR (%) et BCF (Hz) ont diminué de manière significative par rapport à la motilité massale, après 48 heures de conservation aux deux températures (ambiante, réfrigération).

Selon l'expérimentation de **Bergstein-Galan et al. (2017)**, la conservation post mortem des gonades de bélier (testicule et canal épидидymaire) à une température ambiante (18-20°C) pendant : 0 h, 6 h, 12 h, 24 h et 48 h n'a présenté aucune différence significative pour l'ensemble des paramètres spermatiques.

Nichi et al. (2016), ont supposé que l'exposition de l'épididyme à la température ambiante modifie le schéma de déplacement des spermatozoïdes, ce qui signifie que les spermatozoïdes migrent plus lentement dans le tractus génital féminin.

Cox et al. (2006) ont étudié la cinétique des spermatozoïdes dans le sperme de bouc et ont montré que les éjaculats présentent des valeurs plus élevées de VCL, VAP et VSL étaient plus efficaces dans le test de migration du mucus cervical. Cependant, des études menées chez l'homme (**Frèour et al., 2009**), le bélier (**O'meara et al., 2007**), les étalons et les taureaux (**Mocé et Graham, 2009**) n'ont pas trouvé de corrélation entre les paramètres cinétiques évalués par le CASA et la fertilité.

III.2.4 La viabilité des spermatozoïdes

La moyenne du pourcentage des spermatozoïdes vivants récolté après 0 h, 24 h, 48 h et 72 h de conservation à 21.5°C est de 90,57±2,38% ; 76,13 ±1,21% ; 74,33±1,53% ; 40,23±0,68%. Alors que ces paramètres sont de 91.6±2.4% ; 83,17±0,76% ; 82,40±0,87% ; 43,23±0,68% après une conservation in situ à 4°C (tableau 21). Les résultats de l'étude statistique de l'effet du temps post-mortem et la température de conservation sont déterminants à 72 h de stockage des testicules, une diminution significative ($p < 0,01$) du pourcentage des spermatozoïdes viables, s'est produite aux deux températures de stockage des testicules (0E vs 72E ; 0R vs 72R ; $p < 0,001$ respectivement) par rapport au groupe respectif de temps 0 (E, R).

D'après nos résultats, la viabilité des spermatozoïdes de bouc peut être conservée in situ à température ambiante et à température de réfrigération pendant 48h. Les travaux de **Turri et al. (2014)**, ont démontré aussi une différence significative entre les valeurs de la viabilité des spermatozoïdes au fil du temps de conservation (0h, 24h, 48h, 72h) à température ambiante et de réfrigération ; mais avec des valeurs plus basses que nos résultats.

La viabilité des spermatozoïdes n'est pas affectée par la température de stockage ou la durée post-mortem probablement en raison de l'effet protecteur contre le choc thermique, tel que la lécithine contenue dans le liquide épидидymaire (**Robaire et Hermo, 1994 ; Martins et al., 2009 ; Bertol et al., 2013**). Les facteurs de protection sont efficaces dans les 48 heures suivant la mort (**Santiago et al., 2009**).

La préservation prolongée de l'épididyme a entraîné une diminution sévère du pH de l'épididyme, sachant qu'il existe une corrélation entre la mobilité et le pH de la lumière de l'épididyme (**Martinez-Pastor et al., 2005 ; Barati et al., 2009**), et aussi une pycnose des cellules épithéliales de l'épididyme influence sur la qualité de la semence après le stockage de ce dernier (**Barati et al., 2009**).

Des échantillons de sperme épидидymaire de bélier ont montré des spermatozoïdes viables jusqu'à 48 h après la mort de l'animal, même si leur qualité diminue de façon significative avec l'augmentation du temps post-mortem (**Karja et al., 2011**).

Chez le cerf (*Cervus élapus*) et mouflons (*Ovis musimon*), **Garde et al (1998)** et **Karja et al. (2011)** ; ont conclu que la viabilité et la fécondation in vitro diminue lorsque le temps entre la mort de l'animal et le moment de collecte de sperme augmente (jusqu'à 40 h à température ambiante).

Selon l'étude de **Karja et al. (2010)** sur l'espèce ovine, la motilité et la viabilité des spermatozoïdes conservés pendant une longue durée pourraient être encore acceptables, ce qui permet de procéder à une insémination artificielle (IA), à une fécondation in vitro (FIV) ou l'injection intra cytoplasmique (ICSI). Cela pourrait être utilisé dans le cas d'individus de valeur ou d'espèces menacées.

III.2.5 L'intégrité acrosomiale

L'acrosome est une vacuole spécialisée, composée d'une double membrane, située à l'avant du noyau et formée lors de la spermiogénèse pendant la phase de Golgi. L'acrosome couvre les deux tiers de la tête chez l'étalon, la moitié seulement chez le taureau et il est très réduit chez les carnivores. Les enzymes hydrolytiques présentes dans l'acrosome sont responsables de la lyse de la zone pellucide ovocytaire essentielle à la pénétration du spermatozoïde dans l'ovocyte lors de la fécondation (**Ponthier et al., 2014**). L'effet de temps post mortem et la température de conservation des gonades de l'espèce caprine locale est bien démontré dans le tableau 19. Une différence hautement significative ($p < 0,001$) a été observée quel que soit le temps et la température de conservation.

Le pourcentage moyen des spermatozoïdes avec un acrosome intact à une température ambiante (20.5 °C) est de : $97,13 \pm 1,86$ % ; $73,50 \pm 1,20$ % ; $70,10 \pm 0,85$ % ; $52,07 \pm 0,90$ % respectivement, selon le temps de conservation (0h ,24h ,48h ,72h). Tandis qu'à une température de réfrigération (4 °C), il est de : $97,20 \pm 1,8$ % ; $95,17 \pm 0,76$ % ; $84,17 \pm 0,76$ % ; $69,20 \pm 0,72$ %. Malgré l'influence du temps et de la température de conservation sur la qualité de l'acrosome d'un point de vue statistique, les valeurs des spermatozoïdes avec un acrosome intact restent d'excellente qualité jusqu'à 72 h.

L'acrosome est le régulateur central de la fertilisation, il intervient dans la fusion des spermatozoïdes et des ovocytes ainsi que dans l'exocytose de ses constituants pour faire connaître le mécanisme de la fertilisation. L'intégrité de l'acrosome empêchant la dégradation de la zone pellucide et donc l'accès à l'ovocyte.

Les résultats de notre étude sont en accord avec **Swain et al. (2011)**, qui ont enregistré $88 \pm 0,4$ % de spermatozoïdes avec un acrosome intacts, collectés après conservation l'épididyme de bouc jusqu'à 48 h à 4 °C. Selon **Bergstein-Galan et al. (2017)**, l'acrosome résiste mieux à la condition post mortem que la mobilité et la viabilité des spermatozoïdes. Par contre, **Kaabi et al. (2003)** ont montré que l'acrosome des spermatozoïdes épидидymaires de bélier pourrait être sensible à de longues périodes de stockage (48 h).

Dans l'étude d'**Abu et al. (2016)** chez le bouc, le pourcentage de spermatozoïdes avec un acrosome intact diminue significativement ($p < 0,05$) de 0 à 24 h. Les résultats de notre étude étaient en accord avec celle de **Mir et al. (2012)**, qui ont enregistré 89,92% de spermatozoïdes avec un acrosome intact recueillis de la queue de l'épididyme de bélier stockés jusqu'à 48 h à 4°C. Les spermatozoïdes récupérés à partir de cadavres stockés pendant plus de 10 jours à 4°C étaient encore capables de féconder 3% des ovocytes in vitro (**Fernández Abella et al., 2015**).

James (2004) a démontré que les spermatozoïdes prélevés de la queue de l'épididyme des rats, des caprins, des équins et bovins ont tous conservé un certain niveau d'intégrité de la membrane acrosomiale jusqu'à 96 heures après l'autopsie.

Il est suggéré que l'effet protecteur du plasma épидидymaire est lié à la présence de plusieurs systèmes antioxydants (par exemple GPX5, thiorédoxine peroxydase, glutathion S-transférase P, thiorédoxine peroxydase et superoxyde dismutase), à la présence de puissants inhibiteurs de protéases (par exemple macroglobuline, α -1-antitrypsine, eppine, cystatine ; **Dacheux et al., 2009**) et également à la présence de plusieurs composés à activité antimicrobienne, comme la lactoferrine (**Hall et al., 2007**; **Fernández Abella et al., 2015**).

III.2.6 Le test de gonflement hypo-osmotique

La membrane plasmique, composée de lipides, protéines et carbohydrates, crée une enveloppe semi-perméable autour du spermatozoïde et intervient dans la régulation des fonctions spermatiques de par la création d'un gradient ionique. La membrane plasmique constitue la barrière avec le milieu extérieur (**Allimant, 2010**).

Contrairement aux membranes cytoplasmiques des cellules somatiques, cette membrane est hautement spécialisée. Elle est divisée en micro-domaines où des protéines et des lipides spécifiques y sont fixés et dont le rôle est de réguler la physiologie et les fonctions du spermatozoïde. Au niveau de la pièce intermédiaire du flagelle, la membrane plasmique contient des protéines nécessaires à la production de l'ATP mitochondriale et nécessaire à la modulation du glissement des microtubules (**Marc, 2015**). De ce fait, l'évaluation de son intégrité semble être une composante importante de l'évaluation de la semence.

L'analyse des résultats du test de gonflement hypo-osmotique (testHost) dans notre étude, fait ressortir une diminution significative ($p < 0,001$) au cours des 3 jours de conservation, quel que soit la température de conservation des testicules (21.5 °C et 4 °C). À température ambiante, il est de : 86,90±0,79% ; 67,07±0,90% ; 62,33±1,53% ; 47,20±0,72% respectivement, et de 87,00±0,8% ; 74,23±0,68% ; 68,10 ± 0,85% ; 55,23±0,68 % à température de réfrigération (4 °C). La membrane plasmique des spermatozoïdes reste fonctionnelle au cours de toute la période de conservation, suite au maintien de bonnes valeurs.

En ce qui concerne la température de conservation des testicules, les échantillons conservés dans une température de réfrigérateur en général ont montré une meilleure qualité de sperme que ceux conservés dans une température d'environnement, chose confirmée chez le bélier par **Kaabi et al. (2003)** et **Bergstein-Galan et al. (2017)**.

Selon **Oliveira et al. (2013)**, aucune corrélation n'a été trouvée entre les spermatozoïdes réagissant au test hypo osmotique et les autres caractéristiques du sperme chez les caprins.

III.2.7 Anomalies des spermatozoïdes (tératospermie)

Compte tenu des anomalies des spermatozoïdes, aucune différence significative ($p > 0,05$) n'a été observée entre 0h, 24h, 48 h et 72 h de conservation post mortem à la température ambiante (21.5 °C) ($2,40 \pm 0,53\%$; $2,47 \pm 0,75\%$; $3,33 \pm 0,58\%$; $3,37 \pm 0,47$) de même pour les échantillons conservés 4°C ($2,4 \pm 0,5\%$; $2,17 \pm 0,76\%$; $2,58 \pm 0,52\%$; $3,23 \pm 0,68\%$) pendant 72 h. Les données obtenues dans la présente étude font partie de la gamme normale de sperme de bouc de bonne qualité. Ces valeurs sont en accord avec les résultats de **Chemineau et Cognié (1991)** et **Adam (1995)** qui prétendent que le sperme de bonne qualité ne doit pas contenir plus de (20%) de spermatozoïdes anormaux.

Selon **Turri et al., (2014)**, le temps post mortem et la température n'a pas influencé le pourcentage de spermatozoïdes anormaux chez le bouc dans les 48 heures suivant la conservation des testicules. Cependant, après cette période, une augmentation des spermatozoïdes anormaux s'est manifestée, comme cela a été observé chez le cerf (**Soler et al., 2003** ; **Bisset et Bernard, 2005**).

La raison de survie des spermatozoïdes dans l'épididyme à 4°C n'est pas claire. Par ailleurs, en gardant les testicules et l'épididyme à l'intérieur du scrotum, cela devrait être suffisant pour protéger la queue de l'épididyme de la dessiccation (**Karja et al., 2011**). Sachant que les tissus sont le siège de nombreux changements et que l'autolyse a lieu rapidement, les organes reproducteurs ont besoin d'être réfrigérés à 5°C rapidement après la mort de l'animal (**Arnold ,2004**), Selon **Belkadi et al., (2012)**, un sperme épидидymaire de bélier recueilli à partir de la queue de l'épididyme peut être conservé à 4°C jusqu'à 72h , et jusqu'à 12 jours (**Kaabi et al., 2003**).

Chez les animaux vivants, la queue de l'épididyme fournit un environnement approprié pour que les spermatozoïdes immatures deviennent matures et acquièrent leur motilité (**Amann et al., 2000** ; **Lima et al., 2013**) et restent fonctionnels même plusieurs heures après la mort de l'animal (**Dong et al., 2008** ; **Chaveiro et al., 2015**).

Les effets bénéfiques de la température de réfrigération de réduire l'effet métabolique des spermatozoïdes (24, 48, 72 h de conservation), nous ont permis d'obtenir une qualité de sperme épидидymaire nettement meilleure compte tenu du pourcentage de motilité, de la mobilité progressive, des paramètres cinétiques du sperme, du pourcentage de spermatozoïdes vivants, de l'intégrité de l'acrosome, TestHost et de la morphologie des spermatozoïdes.

III.3 Les effets de la température de stockage des testicules (TEMP) et du temps post-mortem (PMT) en post-congélation sur la qualité du sperme épидидymaire chez le bouc de la population locale.

L'étude de l'effet de la cryoconservation du sperme épидидymaire récolté après 0h, 24h, 48h et 72h de conservation des gonades de bouc de la population locale, à deux différentes températures (ambiante et réfrigération) sur la motilité, la mobilité progressive, les paramètres cinétiques, la viabilité, l'intégrité acrosomiale, l'intégrité de la membrane plasmique et le pourcentage des spermatozoïdes anormaux sont bien démontrés dans les tableaux 29,30, et 31.

III.3.1 La Motilité massale

La motilité massale (MM) des spermatozoïdes diminue de manière significative ($p < 0,001$) à mesure que le temps de stockage des testicules augmente de 0h à 72h. La motilité massale des spermatozoïdes après décongélation du sperme récolté à 0h, 24h, 48h et 72h de conservation des testicules à température ambiante est de : $45,23 \pm 0,68\%$; $42,27 \pm 0,64\%$; $50,33 \pm 0,76\%$; $35,07 \pm 1,30\%$ respectivement. À température de réfrigération, il est de : $45,50 \pm 0,28\%$; $46,28 \pm 0,63\%$; $52,07 \pm 1,01\%$; $37,60 \pm 0,55\%$). En ce qui concerne la température de stockage, les spermatozoïdes stockés à 4°C puis congelés ont révélé une motilité massale plus élevée que les spermatozoïdes stockés à $21,5^{\circ}\text{C}$. La valeur de la motilité massale la plus acceptable des spermatozoïdes congelés, a été observée à 48h de conservation des gonades pour les deux températures (ambiante et réfrigération). **Kambulu Lukusa et al. (2020)** ont défini la motilité massale des spermatozoïdes de bouc comme : lente ($>40\mu\text{m/s}$), moyenne ($>70\mu\text{m/s}$) et rapide ($>100\mu\text{m/s}$).

Nos résultats concordent avec ceux de **Martins et al. (2007)**, contrairement **Turri et al. (2014)**, n'ont observé aucune réduction de la motilité après congélation, bien qu'ils aient trouvé des valeurs meilleures que les nôtres.

Chez les espèces domestiques, la motilité des spermatozoïdes congelés-décongelés diminue généralement de 40 à 50% par rapport au sperme frais ; cependant, en utilisant des doses d'insémination contenant de plus grandes quantités de sperme peuvent parfois compenser pour la perte de motilité due à la cryoconservation (**Bezjian et al., 2013**). La cryoconservation de la semence chez l'espèce caprine est un processus complexe qui consiste à équilibrer de nombreux facteurs pour obtenir des résultats optimaux. Le sperme de bouc nécessite une attention particulière pour maximiser la viabilité et la fertilité après décongélation.

Lors de la cryoconservation, les spermatozoïdes sont soumis à des contraintes biochimiques, osmotiques, thermiques et mécaniques, qui sont visibles aux stades de dilution, refroidissement, équilibrage, congélation et décongélation. Alors dans notre expérimentation, la cryoconservation du sperme épидидymaire de bouc récolté après un stockage, in situ pendant 24h, 48h et 72h sous une température ambiante ($21,5^{\circ}\text{C}$) ou de réfrigération (4°C) ; a démontré un pourcentage moyen de spermatozoïdes motiles après décongélation de 50% après 48h de conservation in situ.

C'est une valeur acceptable pour une éventuelle technique de procréation assistée (insémination artificielle...). L'une des principales conditions pour une cryoconservation réussie du sperme est la qualité initiale de l'éjaculat (**Tibary et Manar, 2018**).

III.3.2 La Mobilité progressive

La congélation a influencé d'une façon significative ($p < 0,01$), la mobilité progressive des spermatozoïdes récoltés après 24h, 48h et 72h de conservation in situ. Les données de la mobilité progressive des spermatozoïdes décongelés dans notre expérimentation sont : $22,23 \pm 0,68\%$; $20,23 \pm 0,68\%$; $24,17 \pm 0,76\%$; $22,07 \pm 1,30\%$ respectivement (21.5°C), et de $23,23 \pm 0,60\%$; $20,15 \pm 0,78\%$; $27,20 \pm 1,31\%$; $23,37 \pm 1,45\%$ (4°C). La meilleure valeur de la mobilité progressive des spermatozoïdes congelés est observée après 48 h de conservation in situ.

Les données de **Turri et al. (2014)** ont montré que les échantillons obtenus à partir des testicules stockés sous température ambiante diminuent d'une manière significative la qualité de leur sperme congelé. Résultat en accord avec notre étude, mais avec des valeurs plus basses.

La mobilité progressive est souvent utilisée comme critère principal d'appréciation de la fertilité. Une proportion importante (20 à 30%) des spermatozoïdes cryoconservés perdent leur capacité fertilisante après décongélation (**Tibary et Manar, 2018**). En revanche, le succès de l'insémination artificielle chez les caprins dépend de la capacité de collecter et de cryoconserver correctement les spermatozoïdes. Alors que la cryoconservation des spermatozoïdes de mammifères est un processus complexe qui consiste à équilibrer de nombreux facteurs afin d'obtenir des résultats satisfaisants.

Bien que, pour assurer un succès même minimal, non seulement un diluant, un taux de dilution du sperme, un taux de refroidissement et un taux de décongélation appropriés sont nécessaires, mais également une connaissance approfondie de la physiologie du sperme de l'espèce est essentielle pour maximiser la récupération post-décongélation du sperme et, par conséquent une bonne fertilité (**Sharma et Sood, 2020**).

III.3.3 Les paramètres cinétiques

Les paramètres cinétiques comme : VCL ($\mu\text{m/s}$), VSL ($\mu\text{m/s}$), VAP ($\mu\text{m/s}$), LIN ($\mu\text{m/s}$), STR ($\mu\text{m/s}$), WOB ($\mu\text{m/s}$) du sperme épидидymaire sont diminués d'une façon hautement significative ($p < 0,001$) lors de la congélation, par contre aucune différence significative n'a été observé pour ALH ($\mu\text{m/s}$) et BCF ($\mu\text{m/s}$). La congélation du sperme épидидymaire récolté après stockage des gonades à deux différentes températures (21.5°C et 4°C) et au fils du temps (24h, 48h et 72h) a démontré un effet négatif sur la plupart des paramètres cinétiques dans notre étude. Ce qui s'accorde avec les résultats rapportés par **Turri et al. (2014)**.

Les résultats des paramètres cinétiques obtenus dans la présente étude fait partie de la gamme normale de sperme de caprin de bonne qualité. Cette valeur est en accord avec les résultats de **Lukusa et Kabuba (2020)** qui prétendent que le sperme de bonne qualité doit avoir : VCL ($> 80 \mu\text{m/s}$), VSL ($> 50 \mu\text{m/s}$) et VAP ($> 25 \mu\text{m/s}$).

III.3.4 La viabilité des spermatozoïdes

Le pourcentage moyen de spermatozoïdes vivants après congélation de sperme épидидymaire conservé à 21.5°C et 4°C est de : 48,27±0,64% ; 41,23±0,68% ; 42,30±0,70% ; 40,12±1,75% vs 49.2±0.6% ; 43,33±0,69% ; 45,20 ±0,72% ; 43,27 ±0,64% (0h, 24h, 48h et 72h) respectivement. Concernant l'effet du temps post mortem sur la viabilité des spermatozoïdes après congélation du sperme, les résultats montrent que cette dernière diffère d'une manière hautement significative ($p < 0,001$), et d'une façon significative ($p < 0,05$) par rapport à la température.

Les mêmes constatations ont été rapportées par **Turri et al. (2013)** et **Kaabi et al. (2003)** chez le bélier, et par **Martins et al. (2009)** chez le taureau. Il est généralement admis que le procédé de cryoconservation lui-même réduit de plus de 50% la viabilité du sperme (**Chetna Gangwar et al., 2016**). La motilité massale est généralement considérée comme une indication superficielle de la viabilité du sperme (**O'Hara et al., 2010**). Parallèlement **Kafi et al. (2004)** et **Moghaddam et al. (2012)** ont conclu que, suite à l'augmentation de mouvement des vagues, la quantité de spermatozoïdes vivants sera augmentée. Le faible taux de spermatozoïdes vivants pourrait donc s'expliquer par la faiblesse de la motilité massale enregistrée durant cette étude.

Comme observé chez d'autres animaux domestiques, le processus de congélation du sperme réduit également la viabilité du sperme chez le bouc, dans ce cas, le sperme chez l'espèce caprine nécessite une attention particulière pour maximiser la viabilité et la fertilité après décongélation. Revoir le protocole de la cryoconservation, le diluant utilisé et le nombre de spermatozoïdes par paillette est une exigence.

Le taux de gestation est de 7 à 79% après insémination artificielle (IA) avec du sperme de bouc décongelé (**Bispo et al., 2012**). Différents chercheurs ont rapporté des taux de fertilité différents avec du sperme de bouc cryoconservé (**Chetna Gangwar et al., 2015**).

III.3.5 L'intégrité acrosomiale

Le pourcentage de spermatozoïdes avec un acrosome intacte sur la période d'observation, présente une différence hautement significative ($p < 0,001$) (tableau 29). Nous avons aussi remarqué que toutes les valeurs obtenues durant cette étude sont supérieures à 50%, pour l'ensemble des échantillons cryoconservés après un stockage in situ pendant 48h sous 21.5°C et 4°C. Selon nos résultats, la cryoconservation peut avoir augmenté la résistance de l'acrosome des spermatozoïdes au refroidissement et aux cryodommages.

En revanche d'autres auteurs (**Rasul et al., 2001**, **Mondal et al., 2010**), rapportent que la cryoconservation des spermatozoïdes réduit l'intégrité acrosomiale chez différentes espèces d'animaux.

Alors, la préservation de la fertilité des spermatozoïdes épидидymaires peut être influencée par de nombreux facteurs tels que les conditions dans lesquelles l'épididyme est manipulé, la période de stockage post-mortem de l'épididyme avant la collecte du sperme épидидymaire.

III.3.6 Le test de gonflement hypo-osmotique

L'analyse des résultats du test de gonflement hypo-osmotique (testHost) des spermatozoïdes après décongélation, fait ressortir une diminution significative ($p < 0.001$) au cours des 4 jours de conservation, quel que soit la température de conservation post mortem des testicules (21.5 °C et 4 °C), avec des valeurs comprises entre 40 à 57%.

Le phénomène de choc osmotique provoqué par l'exposition des spermatozoïdes à différentes conditions hypertoniques, se caractérise par une augmentation de l'enroulement de la queue de spermatozoïde, qui se traduit par une perte de mobilité progressive (Zavos, 1983 ; Mehrez, 2001). Pour cette raison, les spermatozoïdes doivent être dilués lentement pour permettre un ajustement osmotique progressif entre les compartiments extracellulaires, empêchant ou minimisant ainsi le phénomène de choc osmotique (Zavos, 1992).

Ces changements se produisent principalement au niveau de la membrane (figure 47) et sont dus à la formation de cristaux de glace et à des changements dans la perméabilité de la membrane.



Figure 47. Résultat du test de gonflement hypo-osmotique (testHOST), (1) Spz gonflé (vivant), (2) Spz non gonflé (mort).

III.3.7 Anomalies des spermatozoïdes (tératospermie)

Notre étude sur l'effet de la cryoconservation du sperme épидидymaire de bouc récolté après une conservation des testicules à deux température (21.5 et 5°C) pendant 24h, 48h et 72h, n'a présenté aucune différence significative ($p > 0,05$). Le temps et la température post mortem n'a pas d'effet sur la morphologie des spermatozoïdes. Le taux de spermatozoïdes anormaux selon notre expérimentation est entre 1 et 3%, ce qui correspond à un pourcentage de spermatozoïdes normaux qui dépasse 95%. Un résultat comparable a été rapporté par Hoseinzadeh-Sani *et al* (2013).

Contrairement aux travaux de Swain *et al.* (2012) et ceux de Turri *et al.* (2014), ils ont démontré une régression du nombre de spermatozoïdes normaux avec la progression du temps de collecte post mortem. Tarai *et al.* (2010) ont signalé une augmentation du nombre de spermatozoïdes anormaux à 25°C en fonction du temps de conservation in situ.

Le calcul de ce pourcentage est important pour apprécier la fertilité des animaux. Une semence est considérée de bonne qualité, si elle contient plus de 70 % de spermatozoïdes normaux, avec moins de 10 % d'anomalies primaires et moins de 20 % d'anomalies secondaires (**Fuertes, 2008**). Pour un taux de spermatozoïdes anormaux entre 10 et 20%, Les taux de fertilité sont de 50 à 60%, et il est à 50% lorsque le pourcentage des spermatozoïdes anormaux entre 40 et 50% (**Baril et al., 1993 ; Issa et al., 2001**).



Conclusion

La récupération post-mortem du sperme épидидymaire peut être la seule possibilité de préserver les gamètes mâles d'animaux de grande valeur ou d'espèces menacées. Pour chaque espèce, des protocoles standards de récolte et de cryoconservation du sperme épидидymaire sont nécessaires. Cette étude a été menée pour comprendre comment la qualité du sperme épидидymaire de la population caprine locale dans les conditions de conservation a été préservée, en particulier, en tenant compte du temps et de la température, et surtout lorsque les spermatozoïdes épидидymaires ne peuvent pas être collectés et cryo-préservés immédiatement.

En conclusion, malgré la réduction des caractéristiques des spermatozoïdes pendant le stockage, les spermatozoïdes épидидymaires de l'espèce caprine (*Capra hircus*), récupérés en post-mortem et stockés à la température de réfrigération ont montré une très bonne motilité, viabilité, testHOST, acrosome intact et spermatozoïdes normaux ; même après 24-48 h post-mortem. En utilisant ce protocole, une bonne qualité de sperme épидидymaire, peut être facilement obtenue à des coûts réduits, améliorant l'utilisation de cette source de sperme dans les banques de gènes.

Troisième volet

Effets des antioxydants (Acide tannique, Trolox, Quercétine) sur le sperme épидидymaire cryoconservé chez la population bovine locale

Effets des antioxydants (Acide tannique, Trolox, Quercétine) sur le sperme épидидymaire cryoconservé chez la population bovine locale

Introduction

Au début des années soixante, les bovins étaient classés en 3 types : races importées dénommées « bovins laitiers modernes (BLM) », populations autochtones dénommées « bovins locaux (BL) » et, les produits de croisements dits « bovins locaux améliorés (BLA) », mais depuis les années soixante-dix et sans justification plausible, il ne subsiste que la dénomination du bovin laitier moderne et bovin local amélioré (**Ben Jemaa et al., 2018**). La population bovine locale de la région du Maghreb (le Maroc, l'Algérie, la Tunisie et la Libye) est communément appelée "Brune de l'Atlas", son principal ancêtre serait le « *Bos Taurus Primigineus Mauritanicus* », découvert par Thomas dans le quaternaire de l'Afrique du Nord (**Ben Jemaa et al., 2018**).

D'autres noms sont attribués aux bovins autochtones du Maghreb en fonction de leur origine géographique et de leurs caractéristiques morphologiques, par exemple, les populations *Guelmoise*, la *Cheurfa*, la *Setifienne* et la *Chelifienne*, originaires d'Algérie. Les populations qui composent la Brune de l'Atlas se différencient nettement du point de vue phénotypique (**Feliachi, 2003 ; Bouzebda Afri, 2007**).

Cependant, l'origine des bovins actuels de l'Afrique du nord est encore controversée, avec deux hypothèses qui font toujours débat. Certaines études ont rapporté que ces bovins domestiqués pourraient être issus d'une domestication indigène africaine de l'aurochs sauvage « *Bos primigenius* » (**Bradley et al., 1996 ; Wendorf et Schild, 1998**) et ont subi, une influence génétique de taurins d'Europe et /ou du Proche-Orient (**Hanotte et al., 2002**). D'autres études ont conclu qu'ils pourraient avoir été introduits en Afrique à partir du premier centre de domestication (**Epstein et Mason, 1972**).

L'élevage bovin en Algérie est à 80% localisé au niveau des zones périurbaines telliennes, Il occupe les régions du Nord du pays, avec une prédominance à l'Est (53 % à l'Est, 24% à l'Ouest et 23% au centre) (**Bouzebda Afri, 2007**). Ce cheptel occupe les zones difficiles, particulièrement les régions montagneuses et les parcours. La population bovine autochtone constituée par des bovins de type local qui sont conservés par des croisements internes, ou par une catégorie de bovins ayant été croisée avec les races importées.

Ce système est orienté vers la production de viande et couvre 80 % de la production bovine nationale, et contribue à 40% dans la production laitière (**Bouzebda Afri, 2007**). Cette population concerne l'élevage extensif traditionnel détenu par les agro-pasteurs qui utilisent les parcours d'altitude et de plaine. Ce système est orienté vers la production de viande et couvre 80 % de la production bovine nationale, il contribue aussi à 40% dans la production laitière (**Bouzebda Afri, 2007**).

L'évolution des effectifs de la population bovine en Algérie est évaluée à 50,77%, et ce de 1910 (1.127.527 têtes) à 2001-2005 (1.464.663 à 1 700.000 têtes) (**Bouzebda Afri, 2007**). Selon le **MADR (2019)**, le cheptel bovin a connu une évolution progressive qui a passé de 1633810 têtes en 2007 à 2149 549 têtes en 2015, le nombre des vaches a diminué tout au long des années pour atteindre moins d'un million en 2017. La population locale représente environ 78% du cheptel total, alors que le cheptel importé et les produits de croisement avec le bovin autochtone sont évalués à environ 22% (59% sont localisés au Nord-est, 22% au centre, 14% au Nord-ouest et seulement 5% au sud du pays) (**Feliachi, 2003 ; Bousbia et al., 2010**).

La population bovine locale en Algérie occupe une place importante dans l'économie familiale et les productions sont destinées pour une auto consommation, en raison de ses caractéristiques de production, de son adaptation et de sa résistance aux conditions climatiques difficiles (chaleur, froid, sécheresse, etc...). C'est une population qui a la capacité de consommer en abondance et de transformer du fourrage de mauvaise qualité, de parcourir des terrains difficiles, de résister aux parasites et aux maladies (en particulier aux vecteurs de maladies) (**Feliachi, 2003**). Toutes ces qualités font que la conservation de cette population s'avère urgente, avant qu'elle ne soit complètement infusée de sang de races modernes.

Le recours à la conservation *ex situ* de la diversité génétique des espèces de mammifères par congélation de la semence (cryoconservation) est une étape cruciale pour la diffusion et la conservation des ressources génétiques animales. Cependant, les procédures de refroidissement lors de la congélation et de réchauffement lors de la décongélation, sont responsables de sévères dommages sur les gamètes mâles, ce qui diminue leur capacité de fécondation.

Ces dommages induits par le froid représentent un facteur limitant de la conservation de la semence (**Marc, 2015**). La peroxydation des lipides membranaires semble être un facteur majeur impliqué dans la qualité de la semence. La sensibilité de la membrane vis-à-vis des dommages oxydatifs est due à son contenu élevé en acides gras polyinsaturés et à une déficience en enzymes protectrices. Ces acides gras donnent à la membrane la fluidité dont elle a besoin pour réaliser la fusion lors de la fécondation (**Büyükleblebici et al., 2014 ; Varo-Ghiuru et al., 2015 ; Aitken et al., 2016**).

Le stress oxydatif est un état associé à un taux accru de dommages cellulaires induits par l'oxygène et les oxydants dérivés de l'oxygène, communément appelés ROS (**Sikka et al., 1995 ; Pena et al., 2011**), qui endommagent systématiquement la motilité des spermatozoïdes, l'intégrité des membranes plasmiques, l'intégrité de l'ADN et la capacité de fécondation (**Alvarez et Storey, 1992 ; Bilodeau et al., 2000 ; Kasimanickam et al., 2007 ; Kao et al., 2008 ; Kadirvel et al., 2009 ; Pena et al., 2011**).

Le sperme des mammifères est doté d'un système antioxydant qui protège les spermatozoïdes contre les effets nocifs du stress oxydatif, mais ce mécanisme de défense endogène des spermatozoïdes contre le stress oxydatif semble peu fiable (**Nichi et al., 2006 ; Lone et al., 2017**).

L'ajout d'un antioxydant au dilueur de congélation pourrait réduire l'impact du stress oxydatif et ainsi améliorer la qualité de la semence après décongélation, car le succès de la cryoconservation dépend non seulement de la préservation de la motilité des spermatozoïdes, mais aussi du maintien de leur fonction métabolique. Pour cette raison, l'ajout d'un antioxydant synthétique peut réduire l'impact de ce phénomène et améliorer la qualité des spermatozoïdes pendant le processus de stockage des spermatozoïdes à long terme, et à assurer dans ce cas le succès des techniques de la procréation assistée comme l'insémination artificielle. Trois antioxydants ont été proposés dans notre thèse :

1. La quercétine (Q), un flavonoïde bien connu, à de nombreuses activités biologiques, notamment ses propriétés antioxydantes (**Hamalainen et al., 2007 ; Gibb et al., 2013**), anti-inflammatoire (**Guardia et al., 2001 ; Hamalainen et al., 2007**) et antimicrobienne (**Nitiema et al., 2012**). La supplémentation en Quercétine (figure 48) au dilueur de sperme a été signalée comme ayant des propriétés antioxydantes bénéfiques sur les caractéristiques post-décongélation des spermatozoïdes de taureaux (**Tvrda et al., 2016**), chevaux (**Seifi- Jamadi et al., 2016**), sangliers (**Kim et al., 2014**), béliers (**Silva et al., 2012**) et de cerfs (**Silva et al., 2016**).

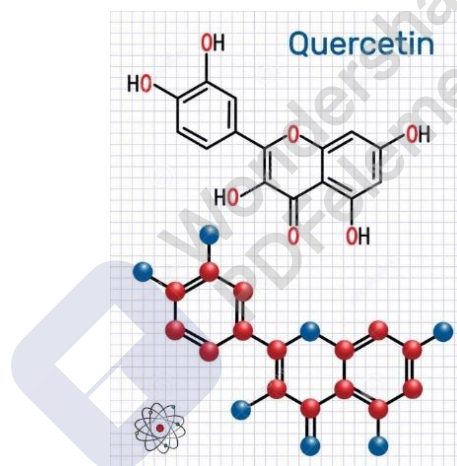


Figure 48. Structure moléculaire de la Quercétine (<https://fr.dreamstime.com/mol%C3%A9cule-flavono%C3%AFde-querc%C3%A9tine-formule-chimique-structurelle-image-121671580>).

2. Le Trolox (TR) est un flavonoïde (analogue de la vitamine E) (figure 49) à la capacité de pénétrer dans les cellules et de protéger la membrane cellulaire grâce à ses propriétés liposolubles et hydrosolubles. Les effets bénéfiques des flavonoïdes ont été liés à diverses propriétés telles que le piégeage des espèces réactives de l'oxygène (ROS), l'inhibition de l'oxydase, et la protection contre les lésions de l'ADN (**Almeida et al., 2018**).

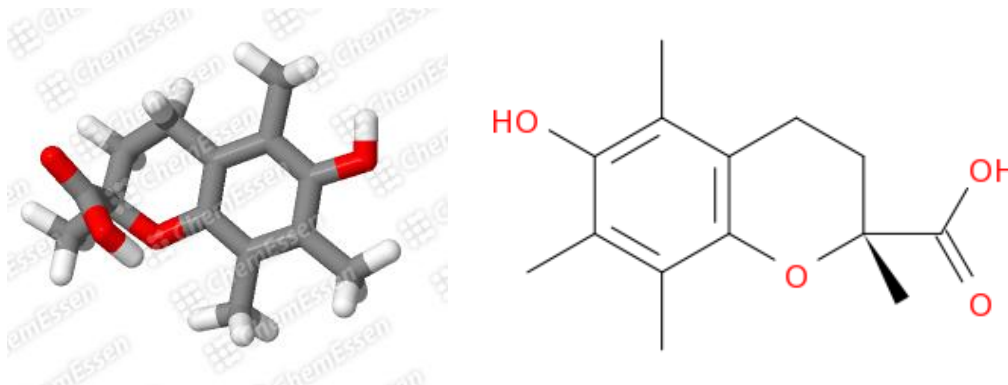


Figure 49. Structure moléculaire du Trolox (<https://www.molinstincts.com/image/R-TROLOX-img-CT1001017787>)

3. L'acide tannique (TA), est un polyphénol hydrolysable, un dérivé de l'acide gallique, plus précisément un polyester de glucose (figure 50), formé à partir du métabolisme des plantes. On le trouve le plus souvent dans l'écorce et les fruits de nombreuses plantes et à une structure composée d'un carbohydrate central (glucose) et de 10 groupes galloïdes (Haslam, 1989 ; King *et al.*, 1999), caractérisés par leur réaction de précipitation avec les protéines (Metché et Gérardin, 1980).

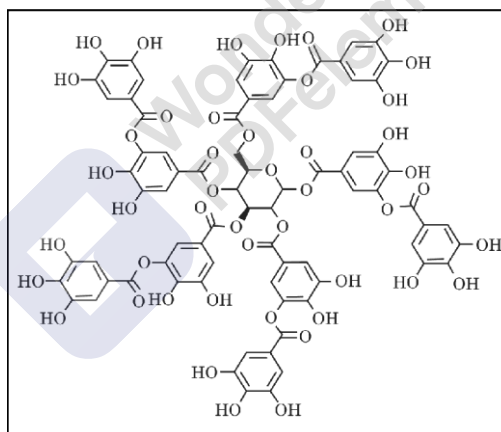


Figure 50. Structure chimique de l'acide tannique <https://www.arcane-industries.fr/details-acide+tannique+et+tanin-120.html>

L'objectif de la présente étude était donc de trouver l'antioxydant le mieux adapté à la cryoconservation du sperme épидидymaire, tel que la quercétine, le trolox et l'acide tannique, afin de créer une banque génétique de la population bovine locale algérienne.

I. Matériels et Méthodes

I.1 Matériels

I.1.1 Site expérimental

Cette étude a été menée de mars 2017 à juin 2019 au niveau du centre de Recherche en Biotechnologie « CRBt ». Le site expérimental est déjà décrit dans la première et la deuxième partie de notre thèse.

I.1.2 Matériels biologiques

Pour la présente étude, 24 testicules ont été recueillis à partir de 12 taureaux de population locale (différents caractères phénotypiques), de 4 à 7 ans d'âge et de 400 à 550 kg de poids vif, provenant de quatre régions (El-Tarf, Constantine, Souk Ahras et Batna).

I.1.3 Matériels non biologiques

Le matériel de prélèvement et d'appréciation de la qualité du sperme épидидymaire chez le taureau et de la cryoconservation, ont été déjà bien détaillé dans le deuxième volet de notre travail sauf :

- Spectrophotomètre pour mesurer la concentration spermatique chez les bovins (AccuRead, IMV Technologie, France) (figure 51),
- Appareil de sonication (VCX-750 Sonics Vibra Cell, à 20 kHz) (figure 52).
- Spectrophotomètre pour mesurer le MDA (*Thermo Scientific, Helio Epsilon*) (figure 53).
- Centrifugeuse (figure 54).



Figure 51. Spectrophotomètre Accu Read bovine



Figure 52. Appareil de sonication

I.1.4 Produits chimiques

Certains produits chimiques ont été cités dans la deuxième partie de la thèse, et on a utilisé en plus :

- L'Acide Tannique (TA) (gallotannin, Tannin ; Sigma–Aldrich Company groups; St. Louis; MO).
- Le Trolox (TR) (analogue vitamin E ; Sigma–Aldrich Company groups ; St. Louis ; MO).
- La Quercétine (Q) (2-(3,4-Dihydroxyphenyl)-3, 5, 7-trihydroxy-4H-1-benzopyran-4-one, 3,3',4', 5,6-Pentahydroxyflavone ; Sigma–Aldrich Company groups ; St. Louis ; MO).
- Pénicilline G sodium.
- L'acide thiobarbiturique (4,6-dihydroxy-2-mercaptopyrimidine, le 4,6-dihydroxy-pyrimidine-2-thiol, TBA ; Sigma-Aldrich groupes Société ; St. Louis ; MO).
- TH (trichloracétique acide 15%), Thiobarbiturique acide 0.375%, et Hydrochlorique acide 0.25N.

I.2 Méthodes

I.2.1 Identification de l'âge et prise du poids des taureaux

La dentition est le seul moyen de détermination de l'âge chez l'espèce bovine on se basant sur le nombre et la forme des dents (incisives) (**Poivey *et al.*, 1981**). L'utilisation de la formule de **Crevât : $P = x (TP)^3$** (**Bouzebda Afri *et al.*, 2007**), est la méthode de choix dans notre étude pour l'estimation de poids vif des taureaux.

I.2.2 Méthode de récolte du sperme

Immédiatement après l'abattage, les testicules récoltés ont été transportés au laboratoire à une température ambiante (18°C). Immédiatement après la collecte, immergée dans un bain-marie réglé à 37°C jusqu'à leur évaluation. Les spermatozoïdes ont été recueillis par la même technique de récolte déjà décrite (volet 2). Selon **Biswas (2016)**, l'échantillon collecté doit présenter les caractéristiques suivantes : Volume $\geq 0,8$ ml, Concentration $\geq 500 \times 10^6$ spz/ml, Motilité $\geq 70\%$, Viabilité $\geq 80\%$

I.2.3 La dilution

Le dilueur doit posséder plusieurs propriétés afin d'améliorer la survie des spermatozoïdes. Il doit être isotonique à la semence afin d'éviter les chocs osmotiques, avoir un pH compatible à la survie des spermatozoïdes, posséder un pouvoir tampon, une osmolarité appropriée, avoir une action stabilisatrice et protectrice des membranes, contenir des substances nutritives telles que des sucres et posséder un pouvoir antioxydant et antibactérien. Il doit également être facile à préparer, à conserver et à être utiliser (**Barbas et Mascarenhas, 2009; Hanzen, 2014**).

I.2.3.1 La composition du dilueur

Il n'existe aucun consensus quant à l'existence d'une composition de dilueur idéal pour le sperme épидидymaire. En règle générale, les dilueurs contiennent des agents cryoprotecteurs dont le rôle est d'augmenter la survie des spermatozoïdes (Ponthier *et al.*, 2014). Dans la plupart des protocoles de cryoconservation, la semence est diluée en une seule étape (Marc, 2015). Le dilueur utilisé dans cette partie est composé selon Anzar *et al.* (2019).

Tableau 32. Composition de la fraction (Anzar *et al.*, 2019).

Composition	Quantité
Glycérol	10% (v/v)
Jaune d'œuf	20% (v/v)
Tris (hydroxyméthylaminométhane)	3,03 g
Fructose	1,25 g
Acide citrique	1,70 g
Pénicilline G sodium	800 ui / ml
Sulfate de streptomycine	1 mg / ml
100 ml d'eau distillé à pH 7,33 et 350 mOsm)	

I.2.3.2 Le taux de dilution ou la concentration finale en spermatozoïdes

La dilution permet d'obtenir une concentration en spermatozoïdes optimale pour la congélation. La concentration finale en spermatozoïdes dans l'échantillon dépend du choix du taux de dilution. Les échantillons de sperme prélevés sur chaque taureau (2 testicules) ont été regroupés et divisés en 4 parties égales (0,1 ml/ aliquote contenant environ 60×10^6 spz/ml). On rajoute la même quantité des antioxydants à la fraction déjà préparée : 5 µg /ml d'acide tannique (TA), Trolox (TR), Quercétine(Q) le quatrième aliquote représente le contrôle (temoin) sans antioxydant.

Selon Marc (2015) et Hanzen (2014) pour le taureau, la concentration en spermatozoïdes zootechniquement acceptable est de 10 à 12 millions de spermatozoïdes par paillette. Estimant à 40% les pertes imputables aux processus de congélation-décongélation, il faut donc obtenir au terme de la dilution une concentration moyenne de 20 millions de spermatozoïdes par paillette de 0,25 ml. Cette valeur peut être revue à la baisse ou à la hausse en fonction de la qualité du sperme récolté. Dans notre expérimentation, la concentration est de 15×10^6 spz/ml pour chaque paillette de 0,25 ml.

I.2.4 Méthode de conservation et de décongélation du sperme épидидymaire chez le Taureau

Le protocole de conservation et de décongélation du sperme épидидymaire est le même que celui appliqué dans le deuxième volet (Effet de la température des testicules, sur la qualité du sperme épидидymaire : Première étape vers la cryo-banque de races locales algériennes).

I.2.5 Méthode d'appréciation de la qualité spermatique après congélation

L'examen microscopique comprend l'étude de la motilité massale, des paramètres cinétiques, du pourcentage de spermatozoïdes vivants, testHOST, de l'intégrité acrosomiale et le pourcentage de spermatozoïdes anormaux, réalisé selon les méthodes décrites dans la partie II (sauf la peroxydation lipidique).

I.2.5.1 Peroxydation lipidique

A. Préparation de l'échantillon

La méthode la plus ancienne pour mesurer la peroxydation lipidique est la détection spectrophotométrique de la malonedialdéhyde (MDA) par le test à l'acide thiobarbiturique (TBA) (Fukunaga *et al.*, 1998). Le MDA, un produit final de la peroxydation des lipides, a été quantifiée en utilisant l'acide thiobarbiturique (4,6-dihydroxy-2-mercaptopyrimidine, le 4,6-dihydroxypyrimidine-2-thiol, TBA; Sigma-Aldrich groupes Société; St. Louis ; MO), selon la méthode décrite par Buege et Aust (1978), Suleiman *et al.* (1996) et modifié par Benhenia *et al.* (2018).

- Quatre paillettes pour chacun des trois traitements, plus le contrôle, sont décongelées dans un bain marie réglé à 37°C pendant 30s,
- Les 4 paillettes de chaque échantillon sont mises dans un Eppendorf étiqueté.
- Le culot de spermatozoïdes a été lavé trois fois par remise en suspension dans 1ml de PBS et re-centrifugation (15,000 g pendant 10 min) (figure 38),



Figure 53. Centrifugation (Sigma*3_30KS) réglé à 15,000g/10min

- Le sperme a été ensuite mis en suspension dans 500 ul de PBS et soumis à une sonication avec une sonde en utilisant VCX-750 Sonics Vibra Cell, à 20 kHz pendant 15s sur la glace. La procédure a été répétée six fois à des intervalles de 30 s.
- 1 ml de la solution TTH (trichloroacetic acid 15%, w/v, thiobarbituric acid 0.375%, w/v in hydrochloric acid 0.25N), préparé au paravent, est rajouté pour chaque échantillon.
- L'incubation est faite dans un bain marie régler à 95°C pendant 1h.
- Les échantillons sont mis dans un bain de glace pour arrêter la réaction,
- Une centrifugation à 18,000 g pendant 15 min est appliquée.

B. Lecture de l'échantillon

- La peroxydation des lipides a été mesurée sur la base du malondialdéhyde (MDA) concentration. Le surnageant a été séparé et l'absorbance a été mesurée à 535 nm dans un spectrophotomètre UV.
- La concentration MDA a été déterminée par le coefficient d'absorption spécifique ($1,56 \times 10^5 / M^{-1}cm^{-1}$).
- Les résultats ont été exprimés en nmoles MDA/ 1.2×10^8 Spz.

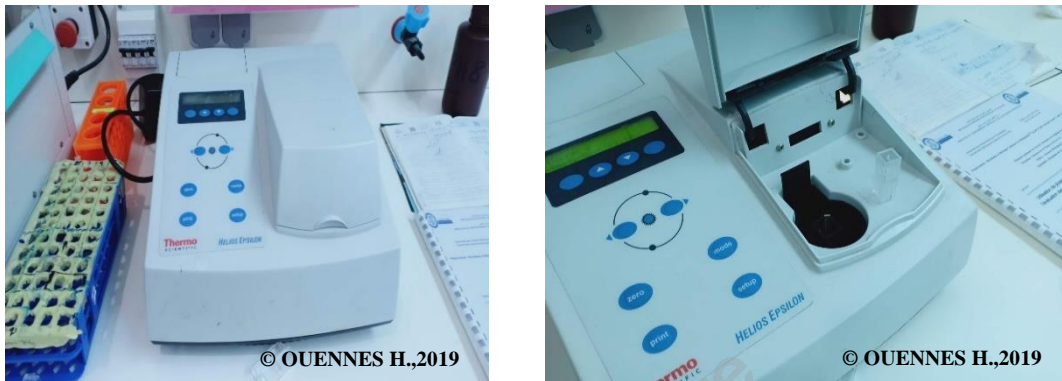


Figure 54. Spectrophotomètre (Thermo Scientific, Helio Epsilon)

I.2.5.2 Étude statistique

Toutes les données ont été analysées par le logiciel SPSS (version 19). L'effet des antioxydants : L'acide tannique (TA), Le trolox (TR) et la quercétine (TQ) sur le sperme épидидymaire congelé ont été évaluées par analyse unilatérale de la variance (ANOVA) avec le test Newman-Keuls, post-hoc test à comparaison multiple. Le niveau de signification a été fixé à *** ($p < 0,001$); ** ($p < 0,01$); * ($p < 0,05$).

II. Résultats

II.1 Effets des antioxydants sur la motilité massale et mobilité progressive ($\bar{X} \pm \text{SEM}$).

Les résultats concernant l'effet des antioxydants : la quercétine, le trolox et l'acide tannique sur la motilité massale et la mobilité progressive, après la décongélation sont présentés dans le tableau 33. Une différence hautement significative ($p < 0,001$) a été observée entre les quatre milieux de dilution (T0, TQ, TA, TR).

L'inclusion de $5 \mu\text{g/ml}$ d'antioxydant améliore les variables de la motilité massale et de la mobilité progressive par rapport au contrôle (T0), la valeur la plus grande a été déterminée dans le milieu de l'acide tannique (TA) avec $58,63 \pm 4,75\%$ et $25,93 \pm 0,23\%$ respectivement pour les deux paramètres mesures.

Tableau 33. Analyse de la variance de la motilité massale et mobilité progressive ($\bar{X} \pm \text{SEM}$).

		N	Moy	Ecart-type	Er std	Min	Max	P
MM (%)	T0	6	31,93	6,26	3,61	25,50	38,00	***
	TQ	6	51,13	3,43	1,98	47,20	53,50	
	TR	6	50,67	2,08	1,20	49,00	53,00	
	TA	6	58,63	4,75	2,74	53,30	62,40	
	Total	24	48,09	10,95	3,16	25,50	62,40	
PM (%)	T0	6	10,34	2,20	1,27	8,20	12,60	***
	TQ	6	21,80	3,74	2,16	17,80	25,20	
	TR	6	21,47	2,53	1,46	18,60	23,40	
	TA	6	25,93	0,23	0,13	25,80	26,20	
	Total	24	19,89	6,41	1,85	8,20	26,20	

MM : motilité massale ; PM : mobilité progressive ; T0 : témoin, TQ : quercétine ; TR : trolox ; TA : acide tannique ; N : nombre d'échantillon ; *** significatif à $p < 0,001$; ** significatif à $p < 0,01$; ns : non significatif

II.2 Effet des antioxydants quercétine, trolox et l'acide tannique sur les paramètres cinétiques ($\bar{X} \pm \text{SEM}$).

Les moyennes, les écarts-types, les minima, les maxima et les coefficients de variation des paramètres cinétiques du sperme épидидymaire après décongélation sont rapportés dans le tableau 34.

Tableau 34. Analyse de la variance des paramètres cinétique ($\bar{X} \pm SEM$).

		N	Moy	Ecart-type	Err std	Min	Max	P
VCL ($\mu\text{m/s}$)	T0	6	79,20	10,74	6,20	66,80	85,70	Ns
	TQ	6	87,72	2,53	1,46	85,10	90,16	
	TR	6	78,28	4,31	2,49	74,10	82,70	
	TA	6	82,53	0,29	0,17	82,20	82,70	
	Total	24	81,93	6,36	1,84	66,80	90,16	
VSL ($\mu\text{m/s}$)	T0	6	42,10	11,72	6,77	32,60	55,20	Ns
	TQ	6	58,10	8,24	4,76	51,70	67,40	
	TR	6	48,03	1,55	0,90	46,63	49,70	
	TA	6	55,88	1,38	0,80	54,45	57,20	
	Total	24	51,03	9,08	2,62	32,60	67,40	
VAP ($\mu\text{m/s}$)	T0	6	52,50	10,45	6,03	42,10	63,00	Ns
	TQ	6	60,13	2,80	1,62	57,40	63,00	
	TR	6	52,67	1,52	0,88	51,60	54,41	
	TA	6	47,00	0,69	0,40	46,60	47,80	
	Total	24	53,08	6,75	1,95	42,10	63,00	
LIN ($\mu\text{m/s}$)	T0	6	52,87	10,60	6,12	44,90	64,90	Ns
	TQ	6	59,30	4,76	2,75	55,70	64,70	
	TR	6	47,33	0,95	0,55	46,60	48,40	
	TA	6	53,73	4,83	2,79	48,40	57,80	
	Total	24	53,31	6,97	2,01	44,90	64,90	
ALH ($\mu\text{m/s}$)	T0	6	2,83	0,55	0,32	2,30	3,40	Ns
	TQ	6	2,22	1,28	0,74	1,46	3,70	
	TR	6	2,83	0,57	0,33	2,20	3,30	
	TA	6	3,13	0,29	0,17	2,80	3,30	
	Total	24	2,75	0,74	0,21	1,46	3,70	
BCF (Hz)	T0	6	6,77	1,59	0,92	5,34	8,48	Ns
	TQ	6	8,00	1,00	0,58	7,00	9,00	
	TR	6	8,87	2,60	1,50	6,20	11,40	
	TA	6	6,57	0,64	0,37	6,20	7,30	
	Total	24	7,55	1,70	0,49	5,34	11,40	

T0 : témoin, TQ : quercétine ; TR : trolox ; TA : acide tannique ; N : nombre d'échantillon ; *** significatif à $p < 0,001$; ** significatif à $p < 0,01$; ns : non significatif.

Selon l'étude de variance des paramètres cinétiques : VCL ($\mu\text{m/s}$), VSL ($\mu\text{m/s}$), VAP ($\mu\text{m/s}$), LIN ($\mu\text{m/s}$), ALH ($\mu\text{m/s}$), BCF(Hz), quelque soit le milieu de dilution aucune différence significative ($P>0.05$) n'a été observée entre les différentes valeurs, avec une supériorité dans le milieu additionné avec la quercétine (VCL, VSL, VAP, LIN).

II.3 Effet de la quercétine, le trolox et l'acide tannique sur la viabilité, LE test HOST, l'intégrité acrosomique et le pourcentage des spermatozoïdes anormaux ($\bar{X} \pm \text{SEM}$).

Tableau 35. Analyse de la variance de la viabilité, testHOST, l'intégrité acrosomique et le pourcentage des spermatozoïdes anormaux ($\bar{X} \pm \text{SEM}$).

		N	Moy	Ecart-type	Err std	Min	Max	P
Viabilité (%)	T0	6	38,23	4,02	2,32	34,00	42,00	***
	TQ	6	51,27	2,00	1,16	49,00	52,80	
	TR	6	52,63	1,60	0,92	51,00	54,20	
	TA	6	49,60	0,87	0,50	48,60	50,20	
	Total	24	47,93	6,30	1,82	34,00	54,20	
HOST (%)	T0	6	41,53	8,30	4,79	32,60	49,00	**
	TQ	6	61,33	4,62	2,67	56,00	64,00	
	TR	6	45,17	1,89	1,09	43,70	47,30	
	TA	6	55,70	5,73	3,31	52,00	62,30	
	Total	24	50,93	9,59	2,77	32,60	64,00	
Int Acro (%)	T0	6	47,57	2,05	1,18	45,50	49,60	**
	TQ	6	58,90	1,65	0,95	57,00	60,00	
	TR	6	58,93	3,72	2,15	55,00	62,40	
	TA	6	52,33	2,52	1,45	50,00	55,00	
	Total	24	54,43	5,47	1,58	45,50	62,40	
Spz anormaux (%)	T0	6	2,97	0,32	0,19	2,60	3,20	Ns
	TQ	6	2,67	0,49	0,28	2,10	3,00	
	TR	6	3,37	1,35	0,78	2,00	4,70	
	TA	6	2,83	1,19	0,69	2,00	4,20	
	Total	24	2,96	0,85	0,25	2,00	4,70	

T0 : témoin, TQ : quercétine ; TR : trolox ; TA : acide tannique ; N : nombre d'échantillon ; test HOST : gonflement hypo-osmotique ; Int Acro: intact acrosome; Spz: spermatozoïde ; *** significatif à $p<0,001$; ** significatif à $p<0,01$; ns : non significatif.

Le rajout des antioxydants dans le dilueur de cryoconservation a entraîné une différence hautement significative ($p < 0,001$) au pourcentage des spermatozoïdes vivants par rapport au contrôle, avec une meilleure valeur observée dans le milieu additionné avec du trolox (TR) ($52,63 \pm 1,60\%$).

Les spermatozoïdes conservés dans un dilueur traité avec $5 \mu\text{g/ml}$ de quercétine (TQ) avait un pourcentage de $61,33 \pm 4,62\%$ de spermatozoïdes avec membrane intact (TestHost) et $58,90 \pm 1,65\%$ d'acrosome intact, plus grand ($p < 0,01$) que le témoin ($41,53 \pm 8,30\%$ et $47,57 \pm 2,05\%$ respectivement) et les autres antioxydants. Un effet significatif a été observé entre le témoin (T0), la quercétine (TQ) et l'acide tannique (TA), et aucune différence entre la quercétine (TQ) et le trolox (TR).

Nous n'avons constaté aucun effet significatif des antioxydants sur le taux de spermatozoïdes anormaux ($p > 0,05$) au cours du processus de congélation du sperme épидидymaire de taureau de la population locale.

II.4 Effet des antioxydants sur la peroxydation lipidique ($\bar{X} \pm \text{SEM}$).

L'étude de la variance des trois antioxydants ajoutés au milieu de dilution sur la peroxydation lipidique a été bien présentée au tableau 36.

Tableau 36. Analyse de la variance de la peroxydation lipidique (MDA) dans les quatre milieux de cryoconservation ($\bar{X} \pm \text{SEM}$).

	N	Moy	Ecart-type	Erreur standard	Min	Max	P
MDA (nmole)	T0	6	2,77	0,07	0,04	2,70	2,84
	TQ	6	1,17	0,02	0,01	1,15	1,18
	TR	6	0,64	0,02	0,01	0,62	0,65
	TA	6	2,85	0,01	0,01	2,84	2,86
	Total	24	1,86	1,01	0,29	0,62	2,86

T0 : témoin, TQ : quercétine ; TR : trolox ; TA : tannique ; N : nombre d'échantillon ; MDA : malondialdehyd ; *** significatif à $p < 0,001$; ** significatif à $p < 0,01$; ns : non significatif.

La détermination du taux de MDA produit de la peroxydation lipidique a montré une différence hautement significative ($p < 0,001$) entre le témoin ($2,77 \pm 0,07 \text{ nmole}$) et les trois dilueurs (quercétine, trolox, acide tannique) ($1,17 \pm 0,02 \text{ nmole}$; $0,64 \pm 0,02 \text{ nmole}$; $2,85 \pm 0,01 \text{ nmole}$), le meilleur milieu est celui avec un taux de MDA plus faible (trolox, $0,64 \pm 0,02 \text{ nmole}$).

II.5 Comparaison entre les quatre milieux de cryoconservation

Le tableau 37 montre l'analyse de variance de milieu de dilution additionné par la quercétine, le trolox et l'acide tannique sur les paramètres spermatiques.

Tableau 37. Analyse de la variance entre les quatre milieux.

	T0			TQ			TR			TA		
	TQ	TR	TA	T0	TR	TA	T0	TQ	TA	T0	TQ	TR
MM (%)	***	***	***	***			***			***		
PM(%)	***	***	***	***			***			***		
Viabilité (%)	***	***	***	***			***			***		
HOST(%)	**		**	**	**			**		**		
Int Acr (%)	**	**		**		**	**		**		**	**
MDA	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***

T0 : témoin, TQ : quercétine ; TR : trolox ; TA : acide tannique ; N : nombre d'échantillon ; HOST : gonflement hypo-osmotique ; Int Acro : intact acrosome ; Spz : spermatozoïde ; MDA : malondialdéhyde ; *** significatif à $p < 0,001$; ** significatif à $p < 0,01$.

III. Discussion

La membrane plasmique des spermatozoïdes est essentiellement composée d'acides gras polyinsaturés (AGPI), qui jouent un rôle essentiel dans la fertilisation (**Mandal et al., 2014**), d'acide docosahexaénoïque (DHA) ; un acide gras essentiel pour la membrane plasmique qui donne la fluidité et donc l'acquisition de la motilité et la réaction acrosomique (**Rooke et al., 2001**). Le processus de cryoconservation du sperme, qui conduit à la diminution de la température, provoque un stress oxydatif sur les membranes des spermatozoïdes, il en résulte des dommages irréversibles aux organites, et des modifications de l'activité enzymatique, associés à une réduction de la mobilité, de l'intégrité fonctionnelle des membranes et de la capacité de fécondation (**Bucak et al., 2009 ; Guthrie et Welch, 2012**).

Le sperme de taureau congelé et décongelé est plus peroxydé que le sperme frais. De plus, la capacité antioxydante intracellulaire du sperme diminue après le processus de congélation-décongélation (**Tuncer et al., 2010**). L'objectif de la présente étude était d'explorer une nouvelle alternative dans la préservation du sperme épидидymaire chez le taureau de la population locale algérienne. Cette approche expérimentale consistait en une protection simultanée contre le choc thermique et le stress oxydatif à l'aide des antioxydants comme la quercétine (TQ), le trolox (TR) et l'acide tannique (TA).

III.1 Effet des antioxydants (Q, TA, TR) sur la motilité massale, la mobilité progressive et les paramètres cinétiques

Dans la présente étude, l'addition de $5\mu\text{g/ml}$ des antioxydants comme la quercétine (Q), l'acide tannique (TA) et le trolox (TR), ont produit une grande activité cryoprotectrice comme l'indiquent les variables relatives aux spermatozoïdes, telles que la motilité massale, la mobilité progressive et les paramètres cinétiques.

III.1.1 Effet de la Quercétine

III.1.1.1 La Motilité massale

La motilité massale du sperme est un paramètre essentiel et fréquemment utilisé pour l'évaluation du potentiel de fécondation des spermatozoïdes (**Yaniz et al., 2015**). Nos résultats montrent que la motilité massale du sperme épидидymaire dilué avec $5\mu\text{g/ml}$ de quercétine est de $51.13\pm 3.43\%$, cette valeur est inférieure à celle enregistrée par **Avdatek et al. (2017)** chez le taureau (sperme éjaculé) ($83.26 \pm 1.10\%$; $59.02 \pm 4.94\%$; $69.42\pm 3.72\%$) et par **Tironi et al. (2019)** à $15\mu\text{g/ml}$ de quercétine (64.43%).

Cependant, ces résultats sont meilleurs que ceux cités par **Avdatek et al. (2017)** à $200\mu\text{g/ml}$ de quercétine ($25,56\pm 4,30\%$) et à $20\mu\text{g/ml}$ de quercétine ($48,86\%$) et que ceux de **Seifi Jamadi et al. (2016)** chez l'étalon à 0.1, Q 0.2 et Q 0.3 Mm de quercétine, respectivement ($48.83 \pm 0.47\%$, $40.5 \pm 1.14\%$, et $41.16 \pm 2.08\%$), ainsi que ceux rapportés par **Ardeshirnia et al., (2017)**, chez le bélier (sperme épидидymaire) à $5\mu\text{g/ml}$ de quercétine (42%).

Khanduja et al. (2001) ont déclaré que la quercétine ne protège pas les spermatozoïdes des dommages causés par les ROS et n'affecte pas positivement la motilité des spermatozoïdes (5-200 mm) chez l'homme.

III.1.1.2 Mobilité progressive

La moyenne générale de la mobilité progressive du sperme épидидymaire de taureau de la population locale dilué avec $5\mu\text{g/ml}$ de quercétine ($21.80\pm 3.74\%$) constatée dans notre étude est supérieure à celle du témoin, alors qu'une influence hautement significative ($p < 0.001$) a été observée. Cela est en accord avec les observations d'**Ahmed et al. (2019)** avec 50 mM, 100 mM, 150 mM et 200 mM de quercétine mais avec des résultats meilleurs (31.11 ± 1.11 ; 30.56 ± 1.55 ; 37.22 ± 1.47 ; $40.56 \pm 1.55\%$).

Ardeshirnia et al. (2017) ont prouvé que la mobilité progressive des spermatozoïdes congelés-décongelés chez le bélier avec l'ajout de 5 et $10\mu\text{g/ml}$ de quercétine n'a pas été affectée par rapport à $0\mu\text{g/ml}$, bien qu'elle ait diminué de manière significative avec 20 et $50\mu\text{g/ml}$ de quercétine. **Tvrda et al. (2014)** ont suggéré un effet protecteur de la quercétine sur la mobilité du sperme chez les bovins. **Gibb et al. (2013)** ont rapporté que la supplémentation de la quercétine à une dose de 0,15 mM a augmenté la mobilité progressive des spermatozoïdes d'étalons par rapport au témoin (absence d'antioxydant).

Les antioxydants pourraient avoir des effets négatifs en raison d'un piégeage excessif des radicaux libres, éventuellement en modifiant leurs niveaux physiologiques (**Najafi et al., 2014**). Comme le montre l'étude de sperme épидидymaire chez le bélier par **Ardeshirnia et al. (2017)**, la viabilité, la motilité et la fertilité des spermatozoïdes ont diminué de manière significative lorsque des concentrations plus élevées de polyphénol quercétine ($\geq 20\mu\text{g/ml}$) ont été utilisées.

Alors, la quercétine peut agir en fonction de la dose, soit comme un stimulant à faible dose, ou un inhibiteur à fortes doses (**Taepongsorat et al., 2008**). Cette controverse s'est d'ailleurs révélée *in vivo* puisque **Aravindakshan et al. (1985)** ont noté que le traitement avec des doses de quercétine plus élevées (300 mg/kg de poids corporel) réduisait le taux de fertilité des rats mâles pendant les deux premiers accouplements.

Inversement, **Taepongsorat et al. (2008)** ont montré que l'injection de 270 mg de quercétine/kg de poids corporel/jour entraînait une augmentation du poids des testicules, de l'épididyme et du canal déférent. En outre, l'administration de 90 et 270 mg quercétine/kg de poids corporel/jour a permis d'améliorer significativement la concentration, la motilité et la viabilité des spermatozoïdes.

La fertilité des spermatozoïdes congelés-décongelés du sperme épидидymaire d'un bélier a été évaluée par la technique de la fécondation *in vitro*. Le nombre moyen d'embryons aux stades de zygote, de morula et de blastocyste a augmenté de manière significative avec l'utilisation de 5 et $10\mu\text{g/ml}$ de quercétine par rapport aux autres traitements ($p < 0,05$) (**Ardeshirnia et al., 2017**).

Ces résultats contrastés peuvent être dus à des différences de dose de la quercétine, de la méthode d'évaluation du sperme, à la procédure de congélation et aussi à l'espèce (**Silva et al., 2012**).

III.1.1.3 Les paramètres cinétiques

L'analyse statistique de l'effet de la quercétine additionné ou dilueur de congélation sur les paramètres cinétiques (VCL, VSL, VAP, LIN, ALH, BCF), n'a révélé aucune différence significative ($p > 0,05$). Ce qui contredit les résultats de **Tironi et al. (2019)**, ou les paramètres VCL, VSL, VAP, WOB et LIN ont augmenté ($p < 0,05$) en fonction de la concentration de la quercétine, toutefois à la concentration de 20 $\mu\text{g/ml}$ aucun changement des valeurs des paramètres cinétiques n'était statistiquement significatif.

Contrairement aux résultats démontrés chez l'étalon par **Seifi-Jamadi et al., (2016)**, aucune différence significative n'a été constatée entre les paramètres cinétiques du sperme (VCL, VSL, VAP, LIN, ALH, BCF) conservé par un dilueur préparé avec 0.2 $\mu\text{g/ml}$ et 0.3 $\mu\text{g/ml}$ de quercétine.

En ce qui concerne la qualité spermatique, selon la littérature, certains paramètres cinétiques fournissent une estimation fiable de la capacité de fécondation des spermatozoïdes, parmi lesquels la VCL. Cette valeur pourrait être importante dans les capacités de fécondation des spermatozoïdes, et abouti à des taux de fécondation *in vitro* plus élevés (**Hirano et al., 2001**).

III.1.2 Effet du Trolox

III.1.2.1 Motilité massale

Le pourcentage moyen de la motilité massale du sperme épидидymaire dans notre étude, additionné par 5 $\mu\text{l/ml}$ de Trolox est de 50,67 \pm 2,08%, qui est supérieur au témoin (31,93 \pm 6,26%). Dès lors, une différence hautement significative ($p < 0,001$) a été constatée avec ce produit (Trolox), et contrairement aucune différence significative ($p > 0,05$) n'a été observée avec les autres antioxydants (Quercétine et Acide Tannique).

Les travaux de **Thuwanut et al. (2008)** sur le sperme épидидymaire de chat, ont aussi prouvé l'effet positive du trolox (5.0 mM) sur la motilité massale des spermatozoïdes après la décongélation avec une différence significative ($p < 0,05$). Selon **Anel-López et al. (2012)**, la motilité massale de sperme épидидymaire chez le cerf, n'a pas montré beaucoup de différence entre le milieu témoin et les dilueurs à base de Trolox. Une bonne motilité massale obtenue après décongélation (60,2 \pm 3,2%), est supérieure à nos résultats (**Anel-López et al., 2012**).

La supplémentation de dilueur avec le Trolox a amélioré la qualité des spermatozoïdes de sanglier pendant la réfrigération (**Pena et al., 2003**) et la cryoconservation (**Pena et al., 2004**), et la qualité du sperme d'étalon pendant la réfrigération (**Ball et al., 2001**).

Chen et al. (2003) expliquent que la différence des résultats peut être attribuée au fait que les spermatozoïdes récoltés de l'épididyme, n'ont jamais été en contact avec les sécrétions des glandes (plasma séminal), où se trouve la plus grande défense antioxydante. Il existe donc des différences entre les spermatozoïdes éjaculés et ceux de l'épididyme congelés (**Gilmore et al., 1998**) dues à la sensibilité au refroidissement (**Schmehl et al., 1986**).

En ce sens, le Trolox aurait pu agir directement et sans compétition dans le sperme épидидymaire, comme l'ont observé **Domínguez-Rebolledo et al., (2007)**, sur le sperme décongelé du bélier redilué avec du plasma séminal.

Silva et al. (2013) ont évalué l'effet de différentes concentrations de Trolox (30, 60 et 120 μM) sur les paramètres cinétiques et sur l'ultra-structure mitochondriale des spermatozoïdes du bélier après cryoconservation. Ils ont déterminé que le Trolox (60 et 120 μM) améliorait la motilité massale et l'ultra-structure mitochondriale.

En outre, **Mata-Campuzano et al. (2014)** ont étudié les effets des antioxydants à base de Trolox (0,2, 1 et 5 mM) et de glutathion (GSH) sur les spermatozoïdes du bélier à différentes températures (5 et 15°C) et pendant différentes durées (48 et 96 h) et ont constaté que le Trolox avait un impact négatif sur la qualité du sperme.

Taylor et al. (2009) et **Minaei et al. (2012)** ont montré l'amélioration significative de l'ajout du Trolox au dilueur du sperme humain dans des échantillons cryopréservés par 0, 20 et 80 μmol de Trolox, le pourcentage de la motilité massale était significativement plus faible dans les échantillons post-décongelés que dans les échantillons traités avec 40 μmol de trolox avant congélation (motilité pré-congélation : 52,2 \pm 8,5% ; motilité post-décongélation : 19,6 \pm 4,3% ; $p < 0,01$).

Rodríguez-Gutiérrez et al. (2020) ont rapporté de meilleures valeurs de motilité massale (57.5 \pm 5.3%) et de mobilité progressive (17.1 \pm 1.6%), lors de l'étude de l'effet de 1 mM de Trolox sur la qualité spermatique chez le bélier sur sperme éjaculé et incubé à 37 °C pendant 0h et 6h. Des différences significatives ont été constatées dans les traitements ($p > 0,05$). Nos résultats sont similaires à ceux rapportés par **Domínguez-Rebolledo et al. (2010)** dans des échantillons décongelés de sperme épидидymaire provenant de cerfs ibériques, où la motilité massale a été maintenue pendant l'incubation à 37 °C. L'effet de Trolox sur la motilité des spermatozoïdes dépend de sa concentration (**Almeida et al., 2018**).

Les observations de **Zhu et al. (2015)** ont suggéré que l'ajout de Trolox au dilueur de congélation chez le lapin (sperme éjaculé), pourrait améliorer la motilité massale des spermatozoïdes congelés-décongelés. Le traitement à la base de Trolox était significativement plus élevé que celui du groupe témoin ($p < 0,05$). Surtout, la motilité massale des spermatozoïdes dans le traitement complété par 200 μM de Trolox était le plus élevé nettement supérieur à celui de 100 μM et de 250 μM .

Coletto (2006) a observé 70 \pm 10% de cellules mobiles (spermatozoïdes) chez des chiens Cocker américains, en utilisant un dilueur complété par 200 M de Trolox. De même, chez les sangliers, **Grossfeld et al. (2008)** ont constaté que l'ajout de substances antioxydantes au diluant du sperme améliore sensiblement la motilité des spermatozoïdes après la décongélation.

III.1.2.2 La Mobilité progressive

Les résultats rapportés dans ce travail montrent qu'une différence hautement significative ($p < 0,001$) a été constatée entre le témoin et l'échantillon de sperme avec $5 \mu\text{g/ml}$ de Trolox, d'où une mobilité progressive de $21,47 \pm 2,53\%$. Des résultats contradictoires ont été observés pour le sperme épидидymaire du cerf, dilué avec 1 mM de trolox, ou la mobilité progressive des échantillons était très faible, avec seulement $4,4 \pm 0,3\%$ des spermatozoïdes identifiés comme étant progressifs (moyenne générale après décongélation) (**Anel-López et al., 2012**). L'étude de l'effet de Trolox sur la qualité spermatique (sperme épидидymaire) chez le chat à différents temps d'incubation (0h-6h) a montré que la mobilité progressive était la plus élevée dans les échantillons pendant l'incubation post-décongélation à 6 h, (**Thuwanut et al., 2008**).

Selon **Minaei et al., (2012)**, l'utilisation d'un analogue hydrosoluble du tocophérol (Trolox) dans la solution de congélation comme antioxydant a augmenté la mobilité en fonction de la concentration de ce dernier. Ainsi, **Silva et al. (2009)** ont pu conclure que l'ajout de $120 \mu\text{M/ml}$ de trolox au diluant utilisé après la décongélation du sperme des équidés (sperme éjaculé) préserve la motilité massale et la mobilité progressive des spermatozoïdes incubés à 37°C pendant 120 minutes. Pendant le processus de maturation, le sperme perd la majeure partie de son cytoplasme, limitant la défense contre le stress oxydatif et devenant dépendant des antioxydants présents dans le plasma séminal (**Baumber et al., 2005**), ce qui met en évidence l'importance de l'utilisation de substances antioxydantes pour le milieu de dilution surtout pour le sperme épидидymaire.

III.1.2.3 Les paramètres cinétiques

L'analyse de l'effet du milieu de dilution avec le trolox sur les paramètres cinétiques (VCL, VSL, VAP, LIN, ALH, BCF) dans notre expérimentation n'a présenté aucune différence significative ($p > 0,05$). Selon **Anel-López et al. (2012)**, le sperme épидидymaire chez le cerf a été influencé par le Trolox d'où une vitesse plus faible en WOB et ALH. Les travaux effectués par **Minaei et al. (2012)** chez l'être humain en ajoutant différentes doses de Trolox dans le milieu de dilution (0, 20, 40, et $80 \mu\text{mol}$), ont prouvé qu'il y avait des différences significatives dans les paramètres cinétiques. De plus, l'ajout de $40 \mu\text{mol}$ de Trolox a permis d'obtenir une vitesse curviligne (VCL), une vitesse en ligne droite (VSL) et une vitesse de parcours moyenne (VAP) significativement plus élevée après décongélation.

La vitesse en ligne droite (VSL) est une valeur principale pour l'évaluation de l'effet de la congélation. Si les spermatozoïdes humains sont exposés à un stress dû à un choc thermique (froid), leur mouvement passera de progressif à curviligne et non progressif. Le traitement par le Trolox pourrait améliorer les caractéristiques de mouvement et de motilité massale, il pourrait également interagir avec la partie hydrosoluble de la membrane plasmique et pourrait être plus efficace que d'autres antioxydants (**Minaei et al., 2012**).

III.1.3 Effet de l'Acide Tannique (TA)

III.1.3.1 La motilité massale

Les résultats de l'effet de l'addition de $5\mu\text{g/ml}$ de l'acide tannique (TA), ont montré une meilleure motilité massale ($58.63\pm 4.75\%$) par rapport aux autres antioxydants (quercétine, trolox), ce qui est justifiée par une différence hautement significative ($p < 0,001$) entre les quatre milieux de dilution. Nijs *et al.* (2009) ont indiqué que le pourcentage de spermatozoïdes mobiles a diminué de 50,6% à 30,3% après la cryoconservation de sperme par un dilueur additionné avec l'acide tannique (TA). Cependant, le mécanisme dont la motilité diminue n'a pas encore été élucidée de manière approfondie.

Les travaux de Taitzoglou *et al.* (2001) sur le sperme humain et de bélier, ont démontré que la motilité des spermatozoïdes examinés à intervalles de 1 à 3 h d'incubation avec $0,1\text{ mmol}$ d'acide tannique, n'affectait pas la motilité des spermatozoïdes chez homme, tandis qu'une forte dose d'acide tannique de 1000 nmol a inhibé significativement la motilité des spermatozoïdes de bélier après 2 et 3 h d'incubation. La motilité et la vitesse élevées des spermatozoïdes sont importantes pour que les spermatozoïdes se lient à la zone pellucide et y pénètrent ; les spermatozoïdes immotiles ne peuvent pas se lier à la zone pellucide ni y pénétrer (Liu et Baker, 1993 ; Yanagimachi, 1994).

De nombreux composés polyphénoliques courants (comme l'acide tannique) qui sont naturellement présents en abondance dans les extraits de plantes, exercent des effets inhibiteurs sur la motilité des spermatozoïdes de mammifères *in vitro*. Ces composés polyphénoliques pourraient être une autre cause d'infertilité ; il est possible que l'augmentation de la génération de radicaux superoxydes par les polyphénols puisse inhiber la motilité des spermatozoïdes *in vitro* (Kumar *et al.*, 1989).

III.1.3.2 La mobilité progressive

Nos résultats montrent une mobilité progressive égale à $25,93 \pm 0,23\%$ chez les spermatozoïdes dilués et conservés dans un milieu avec $5\mu\text{g/ml}$ d'acide tannique, c'est la meilleure valeur observée par rapport à la Quercétine et au Trolox.

III.1.3.3 Les paramètres cinétiques

Dans notre expérimentation aucune différence significative ($p > 0,05$) n'a été observée entre les paramètres cinétiques (VCL, VSL, VAP, LIN, ALH, BCF) des spermatozoïdes conservés dans le dilueur à base d'Acide Tannique. Selon Li *et al.* (1997), l'incubation des spermatozoïdes contenant de l'acide tannique chez le singe, a inhibé de manière significative le pourcentage de spermatozoïdes motiles.

III.2 Effet des antioxydants (Q, TA, TR) sur la viabilité, le pourcentage des spermatozoïdes vivants, test HOST, intégrité acrosomique et les anomalies des spermatozoïdes.

III.2.1 Effet de la Quercétine

III.2.1.1 La viabilité

Le pourcentage moyen de spermatozoïdes vivants est de $51.27 \pm 2.00\%$, la quercétine ($5 \mu\text{g/ml}$) a influencé positivement la qualité spermatique, d'où une augmentation du pourcentage de la viabilité des spermatozoïdes, par rapport au témoin ($38.23 \pm 4.2\%$). Chez le bélier (sperme épидидymaire), la viabilité des spermatozoïdes congelés-décongelés a augmenté de manière significative en utilisant 5 et $10 \mu\text{g/ml}$ de quercétine dans le dilueur de congélation avec une valeur supérieure ($70-78\%$) à nos résultats (**Rodríguez-Gutiérrez et al., 2020**).

Selon **Seifi-Jamadi et al. (2016)**, une diminution significative a été démontrée chez l'étalon (sperme éjaculé) à chaque fois qu'ils augmentent les doses de la quercétine dans le dilueur 0.1 0.2 et 0.3 mM ($52.19 \pm 0.16\%$; $43.19 \pm 1.64\%$; $43.44 \pm 0.90\%$) respectivement. Des valeurs légèrement supérieures à nos résultats à 0.1mM de quercétine ($52.19 \pm 0.16\%$), et inférieures à 0.2 et 0.3mM de quercétine ($43.19 \pm 1.64\%$; $43.44 \pm 0.90\%$) sont observées.

Il est déjà bien connu que l'ajout d'agents antioxydants au diluant du sperme peut avoir un effet bénéfique sur les paramètres séminaux. Dans d'autres travaux, l'extrait lyophilisé d'*Albizia harveyi*, qui contenait 35 composés phénoliques, dont la quercétine et des dérivés de la quercétine, a été complété par le diluant de fructose tris-jaune d'œuf et ajouté au sperme du taureau (**Sobeh et al., 2017**), en conséquence, l'extrait a augmenté le pourcentage de spermatozoïdes viables dans la même proportion que celle que nous avons trouvé et aussi à celle de **Tironi et al. (2019)**.

Des études menées sur l'effet de la quercétine concernant les dommages oxydatifs sur les spermatogonies de poulet ont montré qu'à $1 \mu\text{g/ml}$, il augmentait la concentration cellulaire et réduisait les dommages oxydatifs testiculaires (**Mi et Zhang, 2005**).

III.2.1.2 Test HOST (gonflement hypo-osmotique)

Dans notre travail, au cours du processus de congélation et décongélation, une différence significative ($p < 0,05$) a été remarquée entre le témoin ($41.53 \pm 8.30\%$) et le dilueur avec quercétine ($61.33 \pm 4.62\%$). Ce résultat s'accorde avec ceux rapportés par **Ahmed et al. (2019)** chez le taureau (sperme éjaculé), avec différentes concentrations de quercétine (Q50 mM, Q100 mM, Q150 mM, Q200 mM), et avec des valeurs inférieures à nos résultats ($38.11 \pm 0.81\%$; $38.78 \pm 1.98\%$; $41.11 \pm 1.24\%$; $42.89 \pm 0.89\%$) respectivement.

Selon **Avdatek et al. (2017)**, une différence significative a été observée chez le taureau (sperme éjaculé), avec des valeurs inférieures à nos résultats avec différentes doses de quercétine (25, 50, 100 et $200 \mu\text{g/ml}$), $34.37 \pm 1.71\%$; $32.62 \pm 1.01\%$; $29.87 \pm 1.28\%$; $27.00 \pm 1.70\%$ respectivement. Le même résultat des travaux effectués par **Seifi-Jamadi et al. (2016)** chez l'étalon ou l'intégrité de la membrane a été affectée par des concentrations plus élevées de quercétine (Q 0,2 et Q 0,3 mM), leurs valeurs sont inférieures à celles de notre expérimentation ($42.92 \pm 2.39\%$; $38.78 \pm 1.52\%$; $35.89 \pm 1.52\%$).

Le test hypo-osmotique ou testHOST permet d'évaluer l'intégrité membranaire des cellules. L'intégrité structurelle et fonctionnelle de la membrane plasmique des spermatozoïdes est d'une importance fondamentale pour évaluer la capacité de fécondation (Gibb *et al.*, 2013 ; Ahmed *et al.*, 2016). Selon Sieme *et al.* (2015), la cryoconservation expose les spermatozoïdes à un stress osmotique sévère. Une vitesse de refroidissement optimale est liée à la perméabilité de la membrane, qui est en terme influencée par les propriétés de l'agent cryoprotecteur utilisé et le contenu et l'état de la membrane (Akhoondi *et al.*, 2011).

Selon Pena *et al.* (2004), la protection de la membrane des spermatozoïdes par la Quercétine est expliquée par la capacité pro-oxydante de la quercétine. Il convient de noter que la quercétine doit être convertie en ortho-semiquinone avant d'exercer ses effets d'élimination des ROS tels que le superoxyde et le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). Il a été démontré que l'H₂O₂ oxyde la quercétine en ses intermédiaires réactifs, les ortho-quinone/quinone méthides, dans plusieurs études in vitro (Awad *et al.*, 2002 ; Kaldas *et al.*, 2005).

III.2.1.3 Intégrité de l'acrosome

Notre étude a révélé une différence significative ($p < 0,05$) de l'intégrité acrosomiale entre le témoin ($47.57 \pm 2.05\%$) et ceux ayant reçu des milieux de dilution additionné de quercétine ($5 \mu\text{g/ml}$) ($58.90 \pm 1.65\%$), nos données sont meilleures que celles observées par Ahmed *et al.* (2019) chez le buffle (sperme éjaculé) (46.33 ± 1.01 ; 46.78 ± 1.22 ; 51.78 ± 0.88 ; 53.44 ± 1.18), quel que soit la dose de quercétine utilisée. L'intégrité de l'acrosome des spermatozoïdes est vitale pour que la réaction acrosomiale menant à la fécondation, et il a été démontré qu'elle est l'un des paramètres utiles pour prédire le potentiel de fécondation des spermatozoïdes chez le taureau (Kumar *et al.*, 2012). La quercétine était particulièrement active dans la préservation des membranes des spermatozoïdes, de la texture de la chromatine et des acrosomes (Tvrda *et al.*, 2016).

III.2.1.4 Pourcentage de spermatozoïdes anormaux (téatospermie)

La moyenne globale des spermatozoïdes anormaux ($2,97 \pm 0,32\%$) obtenue dans la présente étude fait partie de la gamme normale de sperme de bonne qualité. Le sperme de bonne qualité ne doit pas contenir plus de (20%) de spermatozoïdes anormaux. La quercétine n'a aucun effet sur la morphologie des spermatozoïdes d'après nos expériences sur la congélation du sperme épидидymaire de taureau de la population locale.

Les données d'Ahmed *et al.* (2019) sont en accord avec ces résultats, ce qui suggère le rôle important de la quercétine dans l'amélioration de la qualité des spermatozoïdes des taureaux. Contrairement aux résultats d'Avdatek *et al.* (2017), ou le taux des anomalies est supérieur à des doses croissantes de quercétine (25, 50, 100, 200 $\mu\text{g/ml}$). Ainsi, chez l'étalon, le pourcentage des spermatozoïdes anormaux ($15.78 \pm 1.34\%$; $14.33 \pm 1.10\%$; $13.67 \pm 1.19\%$) à 0.1, 0.2 et 0.3 mM de quercétine est supérieur à nos résultats (Seifi-Jamadi *et al.*, 2016).

Il a été constaté que les spermatozoïdes présentant des anomalies sont négativement corrélés à la fertilité chez les bovins (**Chandler et al., 1985**), et ne sont pas en mesure de féconder les ovocytes (**Dowsett et al., 1996**).

III.2.2 Effet de Trolox

III.2.2.1 La Viabilité

Dans cette étude, le pourcentage moyen de spermatozoïdes viables est de $52.63 \pm 1.60\%$ dans la fraction additionnée par $5 \mu\text{g/ml}$ de Trolox, avec $38.23 \pm 4.2\%$ pour le témoin, ce qui explique la différence hautement significative ($p < 0.001$) obtenue. Ceci est en désaccord avec les différentes observations rapportées par **Pranay Kumar et al. (2019)** chez le coq, le pourcentage des spermatozoïdes vivants était significativement ($p < 0,05$) plus faible dans le sperme congelé-décongelé, l'inclusion du Trolox (0.2 mM, 0.4 mM et 0.8 mM) n'avait pas d'effets sur ces paramètres. L'incubation à 37°C du sperme décongelé (éjaculé) de bélier entre 0h et 6 h entraîne une diminution au fil du temps de la viabilité des spermatozoïdes avec du Trolox (51mM) (**Rodríguez-Gutiérrez et al., 2020**).

Chez le singe, il est possible de maintenir la viabilité des spermatozoïdes après 270 minutes d'incubation de sperme décongelé, lorsque le dilueur de congélation est complété par $100 \mu\text{M}$ de Trolox (**Almeida et al., 2018**). Une fois la mortalité, les spermatozoïdes libèrent des enzymes qui ont des effets toxiques sur les spermatozoïdes vivants, provoquant des modifications des paramètres cinétiques tels que la diminution de la motilité (**Shannon et Curson, 1972**).

III.2.2.2 Test HOST (gonflement hypo-osmotique)

Le test hypo-osmotique a été utilisé pour évaluer l'intégrité de la membrane plasmique (MP). Le principe de ce test est simple, en effet, les spermatozoïdes présentant une queue (flagelle) gonflée après incubation dans une solution hypo-osmotique sont considérés comme ayant une membrane plasmique intacte : l'eau se déplaçant du milieu hypotonique vers la cellule pour équilibrer l'osmolarité entre le milieu extracellulaire et les compartiments intracellulaires, le volume de la cellule se trouve alors augmenté entraînant une courbure du flagelle (**Hossain et al., 1998**).

Les résultats reportés dans ce travail sur l'effet de Trolox rajouté dans le dilueur de congélation chez le taureau de population locale, montre une valeur moyenne de $45.17 \pm 1.8\%$ des spermatozoïdes avec une membrane plasmique intacte (test HOST), aucune différence n'a été observé avec le témoin, et avec celui du dilueur complété par l'acide tannique juste une légère augmentation, par contre une différence significative ($p < 0,01$) avec le milieu complété par la quercétine est relevée.

Thuwanut et al. (2008) ont constaté lors de la décongélation du sperme épидидymaire de chat (5 mM Trolox) et incubation de 0h à 6h, des valeurs bien meilleures que les notres, ($59.7 \pm 10.6\%$; $43.3 \pm 9.6\%$). Par contre, **Avdatek et al. (2019)** ont observé une augmentation du pourcentage des spermatozoïdes avec membrane intacte de bélier en dehors de la saison de reproduction.

L'intégrité de la membrane et de l'acrosome des spermatozoïdes qui sont considérés comme le principal site de ces modifications dues à un stress thermique, mécanique, chimique et osmotique est essentiel à la survie des spermatozoïdes (**Marcus-Braun et al., 2004**). La survie des spermatozoïdes après congélation et décongélation semble dépendre des propriétés de base de la membrane plasmique, telle que la composition biochimique, la résistance physique, le comportement thermique et osmotique (**Silva et Guerra, 2011**).

III.2.2.3 L'intégrité acrosomiale

La fixation à la zone pellucide stimule le déclenchement de la réaction acrosomique (RA). Cette dernière, du point de vue morphologique est caractérisée par la fusion progressive de la membrane plasmique avec la membrane acrosomique externe du spermatozoïde. Cela donne lieu à la formation d'une part, de vésicules membranaires mixtes et d'autre part de fenestrations au travers desquelles, le contenu de l'acrosome, des enzymes hydrolytiques indispensables pour la fécondation, est libéré.

Les spermatozoïdes ayant subi une réaction acrosomique spontanée après l'éjaculation ou suite au procédé de congélation sont incapables de se fixer à la zone pellucide et par conséquent incapables de féconder l'ovocyte. L'évaluation de l'intégrité de l'acrosome après le processus de congélation-décongélation est donc un paramètre important à étudier. L'intégrité de l'acrosome est un marqueur de l'aptitude fonctionnelle du spermatozoïde à féconder. Nos résultats montrent, une différence significative avec le témoin, et le dilueur additionné avec l'acide tannique, une valeur comparable à celle de la quercétine ($58.93 \pm 2.52\%$).

Cette valeur est aussi comparable à celle rapportée chez le chat (sperme épидидymaire), incubé au fil du temps ($65.1 \pm 8.1\%$; $58.3 \pm 7.3\%$; $53.6 \pm 8.5\%$; $50.1 \pm 7.8\%$) (**Thuwanut et al., 2008**). Ces résultats sont en contradiction avec ceux d'**Anel-López et al. (2012)** chez le cerf (sperme épидидymaire), ou un effet négatif de Trolox (5 mM) a été observé dans la proportion de spermatozoïdes dont les acrosomes sont endommagés.

Les dommages acrosomiques ont augmenté de ($11,1 \pm 1,1\%$) après l'incubation (échantillons de contrôle ; $p < 0,001$), cette augmentation étant significativement plus importante dans les échantillons traités avec Trolox 5 mM ($14,7 \pm 1,1\%$, $p < 0,001$). Une réduction significative du pourcentage de cellules ayant un acrosome intact en raison du temps d'incubation ($p < 0,01$) a été observée chez le cheval (**Silva et al., 2009**).

L'étude de l'intégrité de l'acrosome a montré un pourcentage élevé de cellules intactes pendant les intervalles étudiés, démontrant que dans cette expérience, tous les traitements ont fourni un environnement adéquat pour l'intégrité des membranes plasmatiques et de l'acrosome, évitant les dommages cellulaires et préservant les spermatozoïdes de la formation et de la réaction précoce de l'acrosome communément observés pendant le processus de congélation (**Neild et al., 2003**).

En ce qui concerne le pourcentage de spermatozoïdes dont l'acrosome est intact chez le chien, il n'y avait pas de différence entre les moyennes obtenues après décongélation ($p > 0,9320$), 22,95% pour les échantillons de contrôle ; 24,95% pour les échantillons cryoconservés avec 200 μM Trolox et 23,74% pour les échantillons cryoconservés avec 300 μM Trolox (Peixoto *et al.*, 2013).

III.2.2.4 Pourcentage des spermatozoïdes anormaux

L'étude statistique de l'effet du Trolox sur la qualité spermatique post- décongelée, du sperme épидидymaire de taureau de la population locale, n'a montré aucune différence significative entre le témoin ($2.97 \pm 0.32\%$) et les autres antioxydants ; l'acide tannique ($2.83 \pm 1.19\%$) et la quercétine ($2.67 \pm 0.49\%$). Cette dernière valeur est très proche de celle rapportée chez le coq (Pranay Kumar *et al.*, 2019). Selon Pranay Kumar *et al.* (2019), la fertilité a été significativement augmentée par l'ajout de trolox à 0,2 mM seulement.

III.2.3 Effet de l'acide tannique (TA)

III.2.3.1 La viabilité et le testHOST

Le pourcentage moyen de spermatozoïdes vivants est de $49.60 \pm 0.87\%$, l'intégrité de la membrane est de $55.70 \pm 5.73\%$. Les flavonoïdes sont un groupe de composés naturels de faible poids moléculaire qui sont omniprésents dans les plantes (Havsteen, 1983). Bien que leur mécanisme d'action ne soit pas tout à fait clair, les flavonoïdes agissent comme des inhibiteurs d'enzymes (Kuppusamy *et al.*, 1990).

III.2.3.2 L'intégrité de l'acrosome et la tératospermie

L'intégrité de l'acrosome selon notre expérimentation est de $52.33 \pm 2.52\%$. C'est une bonne valeur par rapport aux autres antioxydants (quercétine, trolox) avec une différence significative, alors que le pourcentage des anomalies est de $2.83 \pm 1.19\%$, aucune différence significative n'a été déterminée.

Les travaux de Taitzoglou *et al.* (2001) ont bien montré que l'acide tannique a de puissants effets inhibiteurs sur l'activité de l'acrosine et du plasminogène chez l'homme et l'espèce ovine. Il est généralement admis que l'activité de l'acrosine, une sérine protéinase unique associée à l'acrosome de spermatozoïdes de mammifères, est indispensable à la fécondation (Meizel, 1984 ; Katz *et al.*, 1987 ; De Jonge *et al.*, 1989 ; Schill, 1991).

Le rôle essentiel de l'acrosine dans la fertilisation est indiqué par la capacité de divers inhibiteurs de protéinase à bloquer la fécondation ou à altérer les fonctions des spermatozoïdes impliquées dans la fertilisation (Saling, 1981 ; Dravland et Meizel, 1982 ; Van der Ven *et al.*, 1985 ; De Jonge *et al.*, 1989).

Li et al. (1997) ont démontré que l'acide Tannique a inhibé l'activité de la hyaluronidase des spermatozoïdes de singe à une concentration entre 50-200 *mmol*. Aussi, selon **Tatemoto et al. (2006)**, l'ajout de 5 $\mu\text{g/ml}$ d'acide tannique aux milieux de décongélation et de fécondation des spermatozoïdes, diminue la polyspermie chez l'espèce porcine. Alors qu'il est intéressant de noter qu'une enquête a montré que certains polyphénols sont de puissants inhibiteurs de hyaluronidase de spermatozoïdes chez le taureau (**Kuppusamy et al., 1990 ; Rachel et al., 2018**), le cobaye PH-20 (**Hunnicutt et al., 1996**), et le singe cynomolgus PH-20 (**Li et al., 1997 ; Meyers et al., 1997**).

L'effet antioxydant de l'acide tannique, a été attribué à sa capacité de former un complexe avec le cuivre qui inhibe l'oxydation des ascorbates et la formation ultérieure de OH, ainsi que le piégeage des OH du complexe TA avec du cuivre (**Andrade et al., 2005**). Compte tenu des nombreux cycles benzéniques et de l'hydroxyle présent dans la structure de l'acide tannique, il est possible que les effets inhibiteurs de l'acide tannique résultent de modifications de la conformation ou de la dénaturation des enzymes causées par la liaison hydrogène ou les interactions hydrophobes entre les enzymes et l'acide tannique.

L'acrosine joue un rôle dans de multiples phases de la fertilisation des mammifères et les activateurs du plasminogène, et le système de la plasmine intervient à plusieurs stades de la fécondation, les flavonoïdes seront des outils utiles pour évaluer l'implication des enzymes acrosomiale dans ces fonctions de gamètes (**Taitzoglou et al., 2001**).

III.3 Effet des antioxydants (Q, TA, TR) sur la peroxydation lipidique

III.3.1 Effet de la Quercétine (Q)

La peroxydation des lipides est une réaction en chaîne qui est un exemple d'oxydation très dangereux pour les cellules provoquées par les dérivés de l'oxygène, en particulier les radicaux hydroxyles (OH) ou peroxydes (ROO), le répercusseur de la peroxydation lipidique et le MDA (malondialdéhyde), le meilleur antioxydant, c'est bien qu'il donne une valeur très faible du MDA.

L'étude de l'addition du Quercétine au dilueur du sperme épидидymaire de taureau est hautement significative, avec une valeur de $1.17 \pm 0.02 \text{ nmole/ml}$ contre une valeur appréciée chez le témoin de $2.77 \pm 0.07 \text{ nmole/ml}$. Nos résultats sont meilleurs que ceux rapportés par **Avdatek et al. (2017)**, pour le sperme éjaculé d'un taureau ($2.92 \pm 0.38 \text{ nM}$; $5.30 \pm 0.64 \text{ nM/ml}$; $8.21 \pm 0.40 \text{ nM/ml}$; $10.03 \pm 0.93 \text{ nM/ml}$) avec des doses de 25, 50, 100 et 200 $\mu\text{g/ml}$ respectivement.

Chez le cheval, et selon **Seifi-Jamadi et al. (2016)**, le MDA à été affecté uniquement à une concentration élevée de quercétine (Quer 0.2 et Quer 0.3 *mM*), ses données sont supérieures à nos résultats ($2.217 \pm 0.18 \text{ nmole/ml}$; $2.476 \pm 0.06 \text{ nmole/ml}$) respectivement. En revanche, **Ben Abdallah et al. (2011)** ont rapporté un effet bénéfique de la quercétine sur la peroxydation des lipides. Dans leur étude, la quercétine a réussi à réduire la concentration de MDA.

Les résultats divergents obtenus avec la quercétine peuvent être attribués à plusieurs facteurs, notamment l'espèce (Evans *et al.*, 1987. Khanduja *et al.*, 2001 ; Hamalainen *et al.*, 2007 ; Gibb *et al.*, 2013), le dilueur et le dosage d'antioxydant (McNiven *et al.*, 2006), et la méthode d'administration (Taepongsorat *et al.*, 2008).

Ardeshirnia *et al.* (2017) ont rapporté un taux de clivage, une formation de morula et de blastocyste plus élevés à partir du sperme épидидymaire des rats, supplémentés avec 5 et 10 $\mu\text{g/ml}$ de quercétine. Khaki *et al.* (2010) ont suggéré que la quercétine, améliorerait significativement la production de sperme et pourrait être efficace pour améliorer la qualité du sperme chez les rats, par conséquent une amélioration significative de la fertilité in vivo. En conséquence, la supplémentation en quercétine peut être une stratégie appropriée pour protéger et préserver les structures et/ou fonctions vitales des gamètes mâles pendant le traitement et le stockage in vitro de spermatozoïdes (cryoconservation, vitrification, etc.) exposés à des environnements cliniques de pression oxydative accrue.

III.3.2 Effet de Trolox (TR)

Le taux de MDA est de 0.64 ± 0.02 nmol/ml, considéré comme meilleure valeur par rapport aux autres antioxydants (quercétine, acide tannique) selon notre étude. Résultat qui concorde avec celui rapporté par Anel-López *et al.* (2012) chez le cerf. Le Trolox a empêché la peroxydation des lipides selon la dose rajoutée. Aucune différence n'a été détectée entre les analyses post-décongélation et post-incubation concernant la production de MDA.

Il est possible qu'il y ait des différences dans la sensibilité des spermatozoïdes à la peroxydation des lipides, l'ensemble des systèmes antioxydants intra et extracellulaires qui se présentent dans le sperme différent selon les espèces (Almeida *et al.*, 2018). La peroxydation lipidique (LPO) était significativement plus élevée ($p < 0,05$) dans le sperme cryopréservé chez le coq ; qui a été réduit par la supplémentation en trolox (0.2 mM, 0.4 mM et 0.8 mM) (Pranay Kumar *et al.*, 2019). Chez le bélier, et en contre saison les résultats de l'effet de 5mM de trolox sur le sperme éjaculé (4.2 ± 0.47 nmol/ml) sont meilleurs que ceux du témoin (6.3 ± 0.61 nmol/ml), et aussi meilleurs à nos résultats (Avdatek *et al.*, 2019).

La peroxydation des lipides est initiée par le radical hydroxyle qui réagit avec l'acide gras polyinsaturé, générant des radicaux organiques libres qui, à leur tour, réagissent rapidement avec l'oxygène pour former du peroxyde d'hydrogène. Ces peroxydes lipidiques, qui agissent comme des radicaux libres, déclenchent une réaction en chaîne autocatalytique entraînant des dommages de la membrane cellulaire (Cotran *et al.*, 1989). Peroxydation des lipides et détérioration ultérieure de la membrane se produisent principalement pendant le processus de décongélation (Sinha *et al.*, 1996).

Les spermatozoïdes eux-mêmes produisent des ROS intracellulaires par l'activité mitochondriale (Amaral *et al.*, 2013). Brouwers et Gadella (2003) ont montré que la peroxydation des lipides (LPO) dans les spermatozoïdes de taureau se produit dans la région médiane de la queue, ce qui suggère une source endogène de ROS identifiée dans les mitochondries.

Le processus d'oxydation des lipides entraîne une perte d'intégrité de la membrane et une augmentation de sa perméabilité qui entraîne une inactivation des enzymes cellulaires, des dommages structurels de l'ADN, une diminution de la motilité des spermatozoïdes, due à l'épuisement de l'ATP en raison de dysfonctionnements mitochondriaux, une diminution de la viabilité des spermatozoïdes et de l'apoptose cellulaire (**Kodama et al., 1996 ; Nichi et al., 2007 ; Kadirvel et al., 2009**).

III.3.3 Effet de l'acide tannique

La mesure de MDA, repercusseur de la peroxydation lipidique a démontré une valeur de $2.85 \pm 0.01 \text{ mmol}$ dans le sperme après congélation avec l'acide tannique ; ce résultat est proche de celui du témoin et la plus élevée par rapport à la quercétine et au trolox, ce qui explique la différence significative qui existe entre les 3 antioxydants utilisés dans notre expérimentation.

La sensibilité des spermatozoïdes chez les ruminants au stress oxydatif est une conséquence de l'abondance des AGPI (acides gras polyinsaturés) dans la membrane plasmique des spermatozoïdes, leur présence donne aux membranes une fluidité et une flexibilité qui les aide à engager des événements de fusion des membranes associé à la fertilisation (**Bansal et Bilaspuri, 2011 ; Collodel et al., 2020 ; Galeati et al., 2020**).

Pendant la maturation épидидymaire, la composition lipidique de la membrane des spermatozoïdes est modifiée. La membrane des spermatozoïdes est remodelée, où le niveau de saturation en acide gras augmente de la tête à la queue de l'épididyme, tandis que la proportion d'acides gras polyinsaturés reste similaire le long de l'épididyme (**Collodel et al., 2020**).

Une augmentation de la peroxydation des acides gras polyinsaturés entraîne une augmentation des concentrations de MDA. Par conséquent, des concentrations plus élevées de MDA sont généralement considérées comme un indicateur de stress oxydatif (**Seifi-Jamadi et al., 2016 ; Aksu et al., 2017**).

La fluidité et l'intégrité de la membrane sont toutes deux importantes pour qu'un spermatozoïde puisse fusionner avec un ovocyte. Des concentrations élevées de peroxydes lipidiques dans les spermatozoïdes ont été corrélées négativement avec leur capacité à fusionner avec l'ovocyte (**Aitken et al., 2017**). En outre, la peroxydation des lipides est également connue pour réduire la motilité des spermatozoïdes (**Bollwein et Bittner, 2018**).

Les polyphénols (y compris les flavonoïdes) ont la capacité d'empêcher la peroxydation des lipides et l'oxydation de l'ADN et éliminer le radical hydroxyle (OH) (**Chimi et al., 1991 ; Lodovici et al., 2001**). Cependant, les polyphénols peuvent également être toxiques, avec des effets prooxydants (**Zaidi et al., 1992 ; Malik et al., 2003**).

Rahman et al. (2012) ont étudié l'influence de la qualité des ovocytes sur la production d'embryons issus de spermatozoïdes endommagés chez les bovins, et ont rapporté que les ovocytes bovins de plus grand diamètre étaient capables de mieux soutenir le développement des embryons après la fécondation avec des spermatozoïdes incubés dans des milieux contenant du peroxyde d'hydrogène (leurs homologues plus petits).

Il est bien établi que les antioxydants exogènes peuvent réduire les effets négatifs du stress oxydatif sur la fonction des spermatozoïdes et le développement de l'embryon. Cependant, il existe encore un manque de connaissances sur la façon dont le stress oxydatif peut être évité sans inhiber les effets physiologiques essentiels des espèces réactives sur la fécondation (**Bollwein et Bittner, 2018**).



Conclusion

La cryoconservation du sperme épидидymaire des bovins de la population locale est une importante technique qui a pour but de préserver le patrimoine génétique ; mais les dommages causés par la cryogénie aux composants cellulaires ont des effets néfastes sur la fonction des spermatozoïdes. La présente étude a été menée pour évaluer l'influence de trois antioxydants : l'acide tannique (TA), la quercétine (Q) et le trolox (TR) sur la qualité des spermatozoïdes congelés.

En conclusion, la supplémentation de dilueur avec $5\mu\text{g/ml}$ d'acide tannique, Quercétine et Trolox peut améliorer la motilité massale et la mobilité progressive, la viabilité, la fonctionnalité de la membrane, l'intégrité de l'acrosome et la peroxydation lipidique, en minimisant le stress oxydatif pendant la congélation et la décongélation.

Suite à nos résultats et aux travaux déjà effectués chez les ovins, équins, volailles, humain et lapins, la quercétine et le Trolox ont montré une supériorité de la cryoprotection contre le stress oxydatif, soit en ajoutant chacun indépendamment ou en combinaison. Alors que pour l'Acide Tannique, le manque de travaux réalisés concernant son effet sur les paramètres spermatiques, nous ont empêchés de bien juger son action, ce qui nécessite plus d'expérimentation.

Alors, il est bien établi que les antioxydants exogènes peuvent réduire les effets néfastes du stress oxydatif sur la fonction du sperme.

Cependant, il existe encore un manque de connaissances sur la façon dont le stress oxydatif peut être évité sans inhiber les effets physiologiques essentiels des espèces réactives sur la fécondation.

Quatrième volet

*E*tat des lieux de la cryobanque à base de sperme épидидymaire pour les ressources génétiques animales en Algérie



Etat des lieux de la cryobanque à base de sperme épидидymaire pour les ressources génétiques animales en Algérie

En raison du manque du matériel de cryoconservation au niveau de l'université de Souk Ahras , et au sein de notre laboratoire , qui a enregistré un retard dans la réception du matériel de recherche , nous avons fait appel pour la cryoconservation de la semence en décembre 2016, au laboratoire privé de cytogénétique de la clinique El Farabi, service PMA dans la wilaya d'Annaba et qui a bien voulu nous recevoir dans ses services .

A partir du mois d'octobre 2017 et pour des raisons de biosécurité, nous nous sommes orientés vers le centre de Recherche en Biotechnologie « CRBt », mandaté par le MESRS pour aider les doctorants à réaliser leurs travaux.

Le matériel de prélèvement et d'appréciation de la qualité du sperme épидидymaire avant et après la cryoconservation et la méthodologie de la cryoconservation a été bien démontré dans les parties précédentes :

1. Volaille (Coq fermier) : La caractérisation du sperme post-mortem chez le coq fermier dans l'est de l'Algérie.
2. Caprin: Effet de la température de conservation des testicules de bouc, sur la qualité du sperme épидидymaire : Première étape vers la cryobanque de populations locales algériennes.
3. Bovin : Effets des antioxydants (Acide tannique, Trolox, Quercétine) sur le sperme épидидymaire cryoconservé chez la population bovine locale.

Le matériel de cryoconservation a été cité en détail dans le deuxième et le troisième volet de la thèse.

Tableau 38. Matériels biologiques conservés.

Espèce	Race	Période du prélèvement	Age	Provenance
Bovins	Locale	Octobre 2017-Février 2020	3-6 ans	El-tarf Souk-ahras Guelma Constantine
Ovins	Ouled djellal	2017-2020	En moyenne 1 an	Batna Constantine
	Berbère	Octobre 2017-Mars 2018	1-2 ans	Souk-Ahras Annaba Constantine
Caprins	Arbia	Mars 2018	Plus 2ans	El-tarf
	Locale	Septembre 2016-Mars 2016 Novembre 2017 Janvier 2018	Plus 2 ans	El-tarf Souk ahras
Volaille	Locale (fermier)	Novembre 2017-Janvier 2018	Plus 1an	El-tarf Constantine

Tableau 39. Nombre de donneur et paillettes conservés de l'espèce bovine

Espèce	Race	Nombre des Donneurs	Nombre de paillettes
BOVINE	Locale 1	02	110
	Locale 2	02	120
	Locale 3	02	104
	Locale 4	03	168
	Locale 5	04	220
	Locale 6	06	307
	TOTAL	19	1029

Tableau 40. Nombre de donneur et de paillettes conservés de l'espèce ovine

Espèce	Race	Nombre des donneurs	Nombre de paillettes
OVINE	Ouled Djellel 1	01	70
	Ouled Djellel 2	01	50
	Ouled Djellel 3	01	40
	Berbére 1	01	58
	Berbére 2	01	50
	Berbére 3	01	80
	Berbére 4	01	72
	TOTAL	07	420

Tableau 41. Nombre de donneur et de paillettes conservés de l'espèce caprine

Espèce	Race	Nombre des donneurs	Nombre de paillettes
CAPRINE	Arabia	01	50
	Arabia	01	70
	Locale 1	02	75
	Locale 2	01	60
	Locale 3	02	52
	Locale 4	02	73
	TOTAL	09	380

Tableau 42. Nombre de donneur et paillettes conservés de l'espèce avicole (coq fermier)

<i>Espèce</i>	<i>Race</i>	<i>Nombre des donneurs</i>	<i>Nombre de paillettes</i>
AVICOLE	Locale 1	01	08
	Locale 2	01	07
	Locale 3	01	09
	Locale 4	01	10
	Locale 5	01	08
	Locale 6	01	08
	TOTAL	06	50

Tableau 43. Nombre total de paillette et d'individus conservé dans la cryobanque

<i>Espèce</i>	<i>Nombre des donneurs</i>	<i>Nombre de paillettes</i>
BOVIN	19	1029
OVIN	07	420
CAPRIN	09	380
COQ	06	50
TOTAL	41	1879

Discussion générale



Discussion générale

Les animaux domestiques, notamment le bétail et la volaille, constituent une source importante de protéines dans les pays en développement. L'augmentation de cette ressource protéique nécessite la conservation de la diversité parmi le bétail indigène. Pour faire face à un avenir imprévisible, il faut maintenir des réserves génétiques locales, résistantes aux conditions environnementales locales difficiles, et capables de réagir rapidement aux contraintes imposées par un large éventail d'environnements. Le maintien de la diversité génétique des animaux domestiques et sauvages, ainsi que les animaux de loisirs comme le cheval, le chien, le chat., est une assurance contre les conditions défavorables futures (**Paiva et al., 2016**).

Au cours des vingt dernières années, des progrès substantiels ont été réalisés dans la conservation des ressources zoo génétiques pour l'alimentation et l'agriculture (AnGR). Au niveau mondial, des programmes nationaux, des organisations non gouvernementales (ONG), et des activités des producteurs œuvrent pour la conservation in vivo et in vitro (banque de gènes) (**FAO, 2007, 2015**).

Dans toutes les régions du monde, des banques nationales de gènes bien établies ou nouvellement créées fonctionnent et assurent la sécurité génétique des ressources animales. Selon le système d'information sur la diversité des animaux domestiques (DAD-IS), de l'Organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO), 15060 races de populations nationales (NBP) sont actuellement signalées par 182 pays, représentant 8803 races et 38 espèces (**FAO, 2018, 2019 ; Leroy et Verrier, 2021**).

La biodiversité algérienne dans le domaine animal est suffisamment cernée. Certains résultats de la recherche scientifique, acquis depuis l'année 2000, sont très prometteurs, comme l'atteste la découverte de nouveaux taxons, y compris dans les régions arides (**Mediouni, 2000**). En Algérie existe un potentiel faunistique important pour l'utilisation des ressources génétiques en faveur du développement durable (**Djaout, 2018**).

La caractérisation des ressources génétiques animales révèle un intérêt considérable ces dernières années. De manière globale, les ressources génétiques disponibles sont d'autant plus et mieux utilisées qu'elles sont bien connues et donc caractérisées. L'objectif de la caractérisation phénotypique, génotypique et des performances est d'obtenir une meilleure connaissance des ressources génétiques animales. Cette connaissance est essentielle pour mettre en place des systèmes de gestion, de conservation et d'amélioration.

Le cheptel algérien, à la fois par son origine et du fait des influences très diverses subies au cours de son histoire, fait preuve d'une diversité importante mais variable selon les espèces (**Yakhlef et al., 2003 ; Djaout, 2018**). L'Algérie a adopté l'ordonnance présidentielle n°06-05 du 15 juillet 2006 relative à la protection et à la préservation de certaines espèces animales menacées de disparition. Ce texte, établit une liste de 23 espèces (**FAO, 2019**).

Un autre statut de protection a été élaboré par le législateur algérien qui est inscrit dans l'annexe du décret n° 12-235 du 24 mai 2012, fixant également la liste des espèces animales non domestiques protégées. Mais le problème réside dans l'application de ces textes.

La liste rouge dénombre aujourd'hui 2.786 espèces animales menacées. Il existe 47 espèces d'oiseaux, 9 mammifères, 457 poissons (sachant qu'aucune espèce de poissons n'est protégée par la législation algérienne), et 2 reptiles (**FAO, 2019**).

La Liste rouge de l'Union Internationale pour la Conservation de la Nature (UICN) pour l'Algérie contient 185 espèces, dont 21 espèces gravement menacées, 22 espèces menacées, 58 espèces vulnérables, 70 espèces quasi menacées et une espèce de préoccupation mineure/quasi menacée (**FAO, 2019**).

L'Algérie, connue pour l'immensité de son territoire et la richesse de ses milieux, recèle des ressources animales extrêmement importantes, tant sur le plan qualitatif que quantitatif, et dont l'importance lui assurerait un développement agricole et rural d'une durabilité incontestable si elles étaient considérées à leur juste valeur (**Abdelguerfi, 2003**). Les ressources animales constituent la base biologique de la sécurité alimentaire. Les diverses espèces locales et la diversité génétique qu'elles renferment jouent un rôle primordial dans le développement économique, social et culturel.

Les ressources animales locales représentent un patrimoine original et unique, en relation avec l'histoire de la région. Elles sont profondément inscrites dans les systèmes de production locaux, à travers leurs modes d'élevage et leurs usages. Elles ont ainsi développé des aptitudes zootechniques particulièrement utiles, en termes de performances de production et de qualité d'adaptation. Ces espèces locales constituent ainsi un modèle d'étude d'intérêt pour la connaissance des caractéristiques d'adaptation des animaux aux conditions d'élevage (**Sahi et al., 2018**).

Les animaux d'élevage ont représenté un élément essentiel des systèmes de production agricole, particulièrement important dans des environnements défavorables où les cultures sont difficiles sinon impossibles. Pour les éleveurs, la diversité zoo génétique représente une ressource où puiser pour sélectionner les animaux et développer de nouvelles races. De façon plus ample, les populations d'animaux d'élevage génétiquement différents permettent à la société d'avoir une plus vaste gamme d'options pour satisfaire les défis des années futures (**Djaout, 2018**). A cet effet plusieurs travaux ont vu le jour sur la caractérisation phénotypique et génotypique en Algérie ; de plus des travaux plus rares sur la résistance des espèces locales en Algérie quoique minimales ont été publiés.

L'objectif de notre étude fait partie d'un grand projet initié par le laboratoire de recherche « production animales, biotechnologie et santé PABIOS » pour la caractérisation d'élevage, phénotypique, génotypique, des performances en vue de la sauvegarde des populations animales autochtones et les moyens de leur conservation à long terme.

Dans ce contexte, plusieurs travaux en forme de publication ou de communication nationales et internationales ont été réalisés par certains auteurs algériens et aussi par l'équipe du laboratoire PABIOS sur la caractérisation phénotypique et génotypique, ainsi que des études sur l'évaluation des performances des espèces animales domestiques.

Ainsi que des études sur la fonction sexuelle et la saisonnalité ont été menées chez les ovins de type local, chez les caprins, chez les dromadaires d'Algérie, chez les ânes et chez les chevaux de race Arabe et Barbe, et sont sanctionnées par des dizaines de publications entre 2015 et 2020 sur les caractérisations phénotypiques, génotypiques et reproductions :

A. Chez l'espèce ovine : Afri-Bouzebda *et al.* (2018) ; Djaout *et al.* (2018) ; Lamraoui *et al.* (2017) ; Belkhiri *et al.* (2017) ; Djaout *et al.* (2017) ; Djaout *et al.* (2015) ; Lamraoui *et al.* (2016) ; Gaouar, 2016 ; Afri-Bouzebda *et al.* (2015) ; Gaouar *et al.* (2015) ; Lamraoui *et al.* (2014) ; Gaouar *et al.* (2011) ; Chellig (1992).

B. Chez l'espèce caprine : Sahi *et al.* (2019) ; Sahi *et al.* (2018) ; Ouchene-Khelifi *et al.* (2018).

C. Chez la volaille : Mahammi *et al.* (2015) ; Mahammi *et al.* (2014) ; Mahammi *et al.* (2011).

D. Chez les Bovins ; Bouzebda-Afri *et al.* (2007) ; Bouzebda-Afri *et al.* (2003).

Depuis quelques années, dans le monde entier l'importance des ressources génétiques s'est accompagnée d'un nombre croissant d'actions visant à les préserver et à les valoriser. Des forums consultatifs internationaux ont été créés au sein de l'Union européenne et de la FAO pour discuter de ce sujet important et déclencher des actions spécifiques pour préserver les ressources génétiques dans le monde entier (**Daunchin-Burge *et al.*, 2002**). La tendance actuelle en matière de conservation ex-situ est d'établir des banques de gènes nationales.

Tableau 44. Exemple de banque de gène à travers le monde (**Pizzi *et al.*, 2013**)

Banque génétique	Site web
<i>Austrian Gene Bank for Endangered Farm Animal Races</i>	www.raumberg-gumpenstein.at
<i>Banco Português de Germoplasma Animal (BPGA)- Instituto Nacional de Recursos Biológicos</i>	http://horta.0catch.com/bpga/bpga.html
<i>Centre for genetic resources the Netherlands</i>	www.wageningenur.nl
<i>CRIONET-IT network-Italy</i>	www.genrescryonet.unimi.it
<i>Conservation Genome Resource Bank for Korean Wildlife</i>	www.cgrb.org/index_e.htm
<i>Cryobank Nationale-France</i>	www.cryobanque.org
<i>European Regional Focal Point for Animal Genetic Resources (ERFP)</i>	www.rfp-europe.org
<i>FABISnet database (cooperation with 17 partners)</i>	http://efabis.tzv.fal.de
<i>Italian Network of Genetic Resources-Italy</i>	www.biogenres.cnr.it
<i>NordGen Farm Animals-Norway</i>	www.nordgen.org
<i>ViaGen-Texas</i>	www.viagen.com
<i>Viking Genetics-Sweden, Denmark, Finland</i>	www.vikinggenetics.com

Dans l'Union européenne, afin de rationaliser le stockage cryogénique des ressources génétiques animales (AnGR), certains pays ont commencé à créer des banques de gène ou des opérations centralisées analogues (tableau 45).

Tableau 45. Exemples de conservation in vitro dans certains pays (Paiva et al., 2016)

Pays	Espèce	Race	Animales	Nombre de doses
L'Autriche	5	29	491	12,095
Brésil	12	25	2,508	93,803
Canada	9	31	3,077	261,083
Colombie	3	16	721	48,220
Finlande	2	6	268	399,600
France	9	181	6,704	334,941
Inde	8	38	276	123,483
Italie	4	30	1,230	296,945
Japon	8	97	5,553	123,182
Pays-Bas	7	59	7,252	311,182
Norvège	2	18	1,071	283,850
Philippines	3	11	118	208,754
Pologne	2	9	214	53,382
le Portugal	3	36	399	195,046
Corée du Sud	4	18	2,123	159,047
Suède	1	7	256	75,744
Ukraine	4	30	209	130,805
États Unis	38	149	35,554	779,720
Totale	–	–	67,906	3, 982,714

Tentatives de création de banque de gène d'animaux en Algérie :

➤ La première en 2010, où l'Algérie a voulu bénéficier de l'expérience égyptienne en matière de banque de gènes végétaux et animaux (<https://www.algerie-dz.com/L-Algerie-veut-creer-une-banque-de-genes-vegetaux-et-animaux.html>).

➤ La deuxième en 2013, un comité sectoriel de valorisation des ressources génétiques, végétales et animales a été mis en place, par le ministre de l'agriculture et de développement rural, pour la création d'une banque algérienne de gènes d'animaux qui sera opérationnel en 2014 (<https://www.algerie360.com/securite-alimentaire-une-banque-algerienne-de-genes-danimaux-et-de-vegetaux-en-2014/>).

Mais malheureusement les deux projets sont à l'état stationnaire jusqu'à ce jour.

Le maintien de la diversité génétique du bétail est considéré comme une condition préalable à la durabilité des systèmes de production animale. Les projets de la gestion des ressources génétiques animales doivent faire partie des requêtes et notamment des opportunités de chaque pays pour leur utilisation (**Paiva et al., 2016, Afri-Bouzebda et al., 2018**). Dans le cadre de la conservation et de l'utilisation durable des ressources génétiques animales (AnGR), les stratégies de conservation sont classées en deux catégories : in situ, c'est-à-dire le maintien des animaux dans les systèmes de production dans lesquels ils ont été développés, et ex-situ référé principalement à la cryoconservation du sperme, des ovules, des embryons ou des tissus (**FAO, 2018**).

La facilité relative de collecte du sperme a été à l'origine de l'intéressement précoce des scientifiques à la cellule spermatique. De même, le nombre important de gamètes que peut contenir un millilitre de semence, lequel peut se compter en milliards pour certaines espèces, a rapidement mis en évidence le rôle du spermatozoïde dans l'amélioration des performances de production (**Belkhiri et al., 2018**). Alors les spermatozoïdes sont les cellules sexuelles les plus accessibles et sont actuellement le principal type conservé dans la majorité des banques de ressources génétiques.

La situation actuelle en Algérie des biotechnologies de la reproduction, notamment spermatiques, nous impose une réflexion stratégique pour déterminer les approches et les opportunités les plus appropriées pour un usage raisonné et efficace dans la protection du patrimoine génétique et dans l'amélioration des productions animales par la création de banque de gène.

Le volet sur lequel nous nous sommes orientées, concerne la création d'une banque génétique à base de sperme épидидymaire dans le cadre de la préservation du patrimoine génétique en Algérie. Débuté dès le projet de notre thèse de magistère avec une caractérisation des béliers que nous avons récoltés et qui répondent à une description phénotypique de « la race ». Le principal objectif de ce travail est de :

- Présenter une technique de prélèvement épидидymaire à partir des meilleurs géniteurs de bélier abattus après engraissement,
- Étudier les variations saisonnières des caractéristiques du sperme épидидymaire,
- Analyser les effets de la conservation « in situ » ; à des températures et temps différents, sur les caractéristiques du sperme épидидymaire (**Ouennes, 2012**).

La documentation sur la diversité des races ovines en Algérie est minime voire absente, ainsi plusieurs races nécessitent une description phénotypique et zootechnique pour connaître leurs performances. D'où l'intérêt de faire des travaux de caractérisation de toutes les « races » chez les espèces locales ainsi que pour les espèces en captivité ou sauvages.

En effet, la notion de race ovine impose l'existence de structures de gestion de population de race pure et leur dérivés (exemples les livres généalogiques, les UPRA= unités de promotion de races) (**Bouzebda Afri, 2007**). De plus, la conduite extensive de la majorité du cheptel national et la faible organisation de la profession ont réduit les impacts par rapport à la productivité où très peu d'actions sont concrétisées en matière d'amélioration des performances.

En effet, les quelques associations d'élevage et de protection des races qui existent sont faiblement actives et peu informées en la matière. Pour remédier à cette situation, l'Institut Technique des Elevages a établi une stratégie pour la gestion et l'amélioration des races (particulièrement les races locales), l'appui à l'organisation de la profession et l'information et la formation de cette dernière.

Dans cette perspective, il a été mis en place en 2004, une stratégie pour faire face à ces problèmes par la création de centres de géniteurs ovins (CGO) aptes à produire des géniteurs améliorés, qui diffuseront le progrès améliorateur à travers les zones où ils sont implantés. Cette démarche se veut participative s'appuyant sur la sensibilisation et la responsabilisation de l'ensemble des acteurs de la filière ovine : éleveurs, fermes pilotes, associations de races et d'élevage ainsi que les autorités locales concernées (CAW, DSA).

L'importance du cheptel ovin réside dans sa richesse en ressources génétiques ; la population locale représentée par des variétés au nombre de douze (Ouled Djellal, Rembi, Hamra, Berbère, Barbarine, D'man, Sidaou, Taâdmit, Tazegzawt, Srandi et Darâa), certaines sont méconnues (Ifilène et Tazegzawt), d'autres sont en danger (D'man), ou sont en voie de disparition (Berbère, Barbarine, Tâadmit et Rembi).

Le choix de la race Ouled Djellal et la race Berbère pour la conservation in vitro dans notre projet est suite aux travaux de **Djaout et al. (2015, 2018) ; Belkhiri et al. (2017), Afri-Bouzebda et al. (2018)**. Lors du choix de reproducteurs et reproductrices, dans le but de l'amélioration génétique des troupeaux par l'utilisation des différentes méthodes des biotechnologies : cas d'insémination artificielle (**Belkhiri et al., 2017**), de transfert embryonnaire chez les ovins (**Afri-Bouzebda, 1985**) et la capacité de la réponse à la stimulation ovarienne à base de GnRH et d'Hcg chez la race Ouled Djellal dans le cadre d'un programme de transfert d'embryons (**Afri-Bouzebda et al., 2015 ; Lamraoui et al., 2014, 2017**). De plus, l'utilisation des brebis de race Ouled Djellal en post partum (**Lamraoui et al., 2016**) et génotypage de la population ovine Algérienne (**Gaouar et al., 2016 ; Djaout et al., 2017 ; Djaout, 2018**).

Des projets de masters réalisés dans la spécialisation (récolte, analyse et conservation du sperme chez l'espèce apicole et les crevettes) : ainsi que des projets de recherche PRFU validés en 2015, et un deuxième validé début 2021 sur la caractérisation phénotypique et des performances, en vue de l'amélioration génétique des espèces animales locales.

Une grande contribution dans des séminaires, congrès, forum et des journées scientifiques nationales et internationales : s'est soldée par les communications sur :

- La Hyène Rayée (**Ouennes et al., 2016 , 2017**),
- Le Bélier : La conservation des espèces animales, utilisation, contrôle du sperme épидидymaire (**Ouennes et al., 2013, 2014, 2015, 2016**),
- Les Bovins : Transfert embryonnaire, transmission de zoonoses par le sperme (**Smadi et al., 2018**).

Les principaux objectifs de la création d'une banque pour nous, sont :

- Etant donné qu'il n'existe pas de livres généalogiques de races et que ces dernières ne sont identifiées que par une description phénotypique et par quelques informations concernant leurs performances,
- Il est important de choisir les animaux qui ont le profil à partir des populations qui proviennent des berceaux de la population visée et/ou d'effectuer une caractérisation phénotypique, et même génotypique en cas de disponibilité des tests,
- De plus le statut sanitaire de l'animal à récolter est à définir avant toute récolte,
- Dans l'urgence de la sauvegarde des espèces ou races en voie de disparition toutes les précautions prises dans le premier cas s'avèrent d'un intérêt secondaire,
- La reconstruction d'une race, en cas d'extinction ou de perte d'une grande partie de sa diversité,
- La création de nouvelles lignées/races,
- Le soutien à la modification ou à la réorientation rapide du processus d'évolution de la race,
- Le soutien aux programmes de gestion cryogénique de petites populations,
- La mise à disposition de ressources pour la recherche,
- Le recours à ce potentiel génétique résistant en cas de modifications environnementales, climatiques ou pathologiques.

1) Nombre de doses à stocker

Une fois que la décision a été prise sur les espèces, races et le type de matériel génétique à collecter, l'étape suivante consiste à déterminer la quantité à conserver. Ces quantités varieront en fonction de l'objectif de la conservation de l'espèce. En général, la reconstitution d'une population nécessitera généralement la plus grande quantité de gène possible (**Mara et al., 2013**).

Les doses de sperme qui doivent être stockées sont fonction des doses requises par parturition ou par éclosion, de la production totale espérée des femelles reproductrices fertiles et du nombre de mâles et de femelles souhaités dans la population reconstituée. Si le sperme est utilisé pour reconstituer les races par rétro croisement, un certain pourcentage des gènes de la population de femelles utilisées dans le rétro croisement sera retrouvé dans la race reconstituée.

Par exemple, chez les bovins, il faut cinq générations de rétro croisements pour obtenir des animaux qui ont plus de 95 % du génotype de la race restaurée à partir du sperme congelé. Il faut stocker du sperme en quantité suffisante pour produire le nombre de générations rétro croisées requises (**Blackburn, 2004 ; Mansbridge, 2004**). D'une façon générale le nombre de dose dépend de l'espèce, de sa prolificité et de la durée de la longévité de l'animal.

On peut dire que, le nombre d'échantillons par race dépend de l'espèce. Il est fixé selon le nombre d'échantillons nécessaires pour être capable dans le pire des cas de recréer intégralement une race après 5 ou 6 générations de croisement retours, tout en limitant le niveau de consanguinité.

2) Réglementation et loi de création de la banque de gène en Algérie

Avant toute installation officielle d'une banque génétique pour la conservation des ressources animales un écrit au ministère de l'Agriculture, au ministère de l'Environnement et au ministère de l'Enseignement supérieur et de la recherche scientifique sera envoyé. Le passage par l'identification du cadre politique, légale (loi et réglementation) et zoo sanitaire, permettra le stockage et favorise l'accès aux ressources zoo génétiques détenues dans les banques de gènes nationales et multinationales.

Les textes officiels algériens régissant ce volet sont cités dans les références suivantes **Journal Officiel de la République Algérienne n° 48** :

- Loi n° 14-07 du 13 Chaoual 1435 correspondant au 9 aout 2014 relative aux ressources biologiques.
- Vu la Constitution, notamment ses articles 12, 17, 119, 120, 122, 125 (alinéa 2) et 126, Loi n°14-07 du 13 Chaoual 1435 correspondant au 9 août 2014 relative aux ressources biologiques (revoir annexe).
- Un arrêté ministériel sera délivré pour la création d'une banque de gène après une révision de la réglementation.

3) Sécurité des banques de gènes

Les matériels d'origine animale, y compris les liquides biologiques, les gamètes et les embryons peuvent renfermer des pathogènes capables de survivre à la cryoconservation. Les germes susceptibles d'être transmis par le sperme et donc indirectement par l'insémination artificielle sont répartis en trois catégories (Tableau 46) :

- La première rassemble ceux dont le risque est majeur et largement reconnu.
- La seconde ceux pour lesquels dans l'état actuel des connaissances on peut dire que le risque est faible.
- La troisième comprend les germes pour lesquels on ne dispose que d'informations parcellaires, non unanimement rapportées en ce qui concerne la possibilité d'un risque et l'autre pour lesquels on ne dispose d'aucune information circonstanciée.

Nous nous limiterons à développer 6 facteurs infectieux parmi les principaux : l'IBR/IPV, le BVD, la brucellose, la leptospirose, la campylobactériose et la trichomoniose (**Rodriguez-Morales et al., 2014 ; Hanzen, 2016 ; Givens, 2018**).

Tableau 46. Risque de transmission de facteurs infectieux par le sperme chez les bovins et les petits ruminants (**Hanzen, 2016**).

1. Risque modéré à élevé	2. Risque de transmission faible	3. Peu d'informations disponibles
- Brucellose	Blue tongue	- Paratuberculose
- BVD	Leucose	- Pleuropneumonie contagieuse
- Campylobactériose	enzootique	- Fièvre Q
- Fièvre aphteuse Haemophilose	Leptospirose	- Rage
- IBR		- Listériose
- Mycoplasmoses Pseudomonas		- Anaplasmose
- E.Coli		- Babesiose
-Stomatite vésiculeuse Trichomonase		- Chlamydie
- Tuberculose		- Champignons

Une recherche plus approfondie sera nécessaire pour évaluer les risques de transmission par stockage dans les banques de données (**FAO, 2008 ; 2019 ; Domoslawska et Zdunczyk, 2020**). Les banques de gènes pour conserver le matériel génétique des ressources zoo génétiques doivent proposer un stockage techniquement sécurisé et satisfaire des prescriptions zoo sanitaires rigoureuses. Alors il faut revoir la qualité sanitaire des animaux dont le sperme doit être conservé. La contamination peut être aussi possible lors de la manipulation du matériel au laboratoire (Stérilisation du matériel est préconisée).

➤ Sécurité technique

La perte d'azote liquide peut à tout instant (soit en quelques minutes) avoir pour résultat la perte complète du matériel cryoconservé. Le stockage des matériels cryoconservés dans deux récipients et, si possible, dans deux emplacements différents limite les risques de pertes résultant d'un défaut accidentel de fourniture en l'azote liquide. Une autorisation de remplissage et de déplacement de l'azote liquide auprès de la gendarmerie est obligatoire, pour des raisons de sécurité ; l'installation d'une station de transformation de l'azote liquide reste la meilleure solution.

On peut dire que la réalisation complète de notre projet qui est la création d'une banque génétique à base de sperme épидidymaire pour la conservation et la préservation du patrimoine génétique comme première en Algérie préconise :

- La mise en place d'une réglementation rigoureuse concernant la préparation, la conservation et l'utilisation du matériel génétique.
- Aussi une réglementation concernant la propriété et la protection de ce matériel.

L'inclusion de plusieurs partenaires comme : L'INRA, L'ITELV, les associations des vétérinaires privés, des fermes pilote, des abattoirs privés et étatiques, centre de recherche, CNIAAG pour la mise en place du projet du laboratoire de recherche *production animales, biotechnologie et santé (pabios)*affilié à l'université de Souk Ahras et propriété du secteur public par le biais du MESRS.

4) Effet de la cryoconservation chez les espèces conservées

La conservation à basse température et la congélation des spermatozoïdes sont des méthodes privilégiées pour la diffusion du progrès génétique. La cryoconservation du sperme aviaire est une biotechnologie très ancienne, nombreuse 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 ont été rapportés par **Shaffner et al. (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 des recherches se sont intéressés à la cryoconservation du sperme du coq (**Bellagamba et al., 1993 ; Fulton, 2006 ; Long, 2006 ; Blesbois, 2007 ; Madeddu et al., 2015**).

Au cours des années, de nombreuses méthodes de congélation du sperme de coq ont été étudiées, avec différents cryoprotecteurs, tels que : Le glycérol, le diméthyl acétamide (DMA), le DMSO et récemment N-méthylacétamide (**Tselutin et al., 1999 ; Sasaki et al., 2010 ; Madeddu et al., 2015**). Différents moyens de conditionnements des spermatozoïdes tels que les flacons et les paillettes et avec des procédures de congélation lente et rapide (**Seigneurin et Blesbois., 1995 ; Tselutin et al., 1999 ; Blesbois et al., 2007 ; Blanco et al., 2012**).

Malgré les avancées réalisées dans le domaine de la cryoconservation, le sperme aviaire présente toujours des difficultés à la congélation qui est due aux caractéristiques physiologiques des spermatozoïdes du coq qui pourraient influencer sur leur conservation. Les spermatozoïdes aviaires sont généralement reconnus comme étant plus sensibles à la cryoconservation que ceux des mammifères et les taux de fertilité du sperme de volaille cryopréservé sont nettement inférieurs à ceux de n'importe quelles autres de mammifères domestiques (**Long, 2006 ; Zaniboni et al., 2014**).

En outre, la biologie de la reproduction des oiseaux influe sur le pouvoir fécondant des spermatozoïdes cryopreservés (**Nguyen, 2014 ; Rakha et al., 2020**). Cependant, la qualité du sperme congelé/décongelé, ainsi que les taux de fécondité obtenus après insémination artificielle à l'aide du sperme cryopreservé sont relativement faibles. Cela est en partie dû à certaines caractéristiques biologiques et physiologiques uniques des spermatozoïdes d'oiseaux qui les rendent potentiellement plus sensibles aux dommages causés par le gel (**Donoghue et Wishart, 2000 ; Blesbois, 2007 ; Blanco et al., 2008 ; Partyka et al., 2016 ; Rakha et al., 2020**).

Alors la cryoconservation est un processus dangereux qui induit de nombreux changements défavorables dans les spermatozoïdes. La congélation et la décongélation causent des dégâts qui se produisent principalement au niveau des membranes de la cellule. La conséquence directe des importantes variations de température et de pression osmotique, se traduisent notamment par la formation de cristaux de glace à l'intérieur et autour de la cellule (**Hammerstedt et al., 1990 ; Watson, 2000 ; Nguyen, 2014 ; Santiago-Moreno et Galarza Lucero, 2019**).

Les membranes de spermatozoïdes aviaires sont riches en acides gras polyinsaturés et peuvent de plus facilement subir une peroxydation lipidique (LPO) en présence de dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) lors du processus de congélation (**Cerolini et al., 2006**).

Bien que la réduction de la viabilité ne soit pas entièrement due aux lésions de la membrane plasmique durant la congélation, nous savons que les espèces à faible viabilité post-décongélation ont un ratio plus élevé d'acides gras insaturés/saturés, et des niveaux de cholestérol dans la membrane moins élevés (**Waterhouse et al., 2006 ; Partyka et al., 2016**).

Durant la cryoconservation du sperme, les procédures de refroidissement lors de la congélation et de réchauffement lors de la décongélation, sont responsables de sévères dommages auprès des gamètes mâles, ce qui diminue leur capacité de fécondation. Ces dommages induits par le froid représentent un facteur limitant de la conservation de la semence. Le processus de cryoconservation comprend plusieurs étapes, depuis la préparation de la semence et sa dilution jusqu'à la décongélation : à chaque étape, les spermatozoïdes peuvent perdre leur capacité à fonctionner normalement (**Mara et al., 2013**).

Lors de la décongélation, les spermatozoïdes subissent un stress hypotonique, visiblement plus préjudiciable que le stress hypertonique induit lors de la congélation. Une décongélation rapide est préconisée (**Mara et al., 2013 ; Marc, 2015**). Selon **Ouennes (2012)**, l'étude de l'effet de la conservation du sperme chez le bélier (Ouled Djellal et Berbère), récolté après 2 h d'abattage avec ceux récoltés après une conservation in situ à 5°C pendant 24 h, avant la congélation du sperme a démontrés les résultats suivants :

- La motilité et la viabilité des spermatozoïdes sont considérées comme des facteurs importants pour la détermination de la qualité de sperme et par conséquent de la fertilité potentielle d'un bélier (**Martí et al., 2011 ; Martí et al., 2012 ; David et al., 2015**).
- La motilité massale, utilisée comme index de survie a été mesurée à 2h après abattage et 24 h après une conservation des gonades à 5 °c. Aucune différence significative ($p > 0.05$) n'a été observée dans l'évolution de la survie des gamètes conservée in situ dans l'organe (testicule entier).

A 24h de conservation à 5°C, les spermatozoïdes sont encore mobiles ($2,87 \pm 1,4$) (60-70%). Sachant que la motilité massale est la plus touchée, la membrane et l'intégrité acrosomique semblait mieux supporter les conditions post-mortem (**Martinez-Pastor et al., 2005**). Ces résultats sont comparables à ceux de **Guérin et al., (2003)**, qui ont conservé des spermatozoïdes dans l'épididyme intact ou in vitro à 4°C pendant 24, 48 et 72h. Une conservation des testicules à 4.9-6°C, jusqu'à 72 h, a donné d'excellents résultats pour les différents paramètres spermatiques (motilité, concentration, spz anormaux ...) (**Lone et al., 2011**).

Le pourcentage des spermatozoïdes vivants et morts récoltés après 2h d'abattage et après 24h de conservation à 5°C ne présentent pas de différence significative ($p > 0.05$). Des échantillons de sperme ont montré des spermatozoïdes viables jusqu'à 48 h après la mort de l'animal, même si leur qualité diminue de façon significative avec l'augmentation du temps post-mortem (**Karja et al., 2011**).

La différence entre le pourcentage des spermatozoïdes anormaux récolté après 2h d'abattage et celui conservé après 24h à 5°C n'est pas significative, la durée de conservation n'a pas d'effet sur le pourcentage des spermatozoïdes anormaux. Le sperme épидидymaire récolté après stockage à 5°C, a montré une meilleure mobilité et un plus faible pourcentage de formes anormales que la conservation de l'épididyme à température ambiante après 24 h et 48 h (**Karja et al., 2011**). Alors on peut dire que le sperme épидидymaire récolté après 24h de conservation in-situ (dans l'épididyme non retiré du testicule) à 5°C, préserve ses caractéristiques de fertilité, et dans ce cas on peut effectuer une cryoconservation.

La congélation des spermatozoïdes chez l'espèce ovine est actuellement dans une situation stable en raison de la faible diffusion de ce procédé en raison du degré très réduit de la fertilité obtenue lorsque le sperme congelé-décongelé est utilisé pour l'insémination (cervicale), surtout en cas d'œstrus induit (**Curry, 2000**). Le succès de la cryoconservation de la semence réside dans le maintien de l'intégrité des membranes spermatiques après décongélation. Or, la congélation induit des dommages aux spermatozoïdes entraînant une diminution considérable de leur capacité fécondante.

Ces techniques de congélation détériorent la qualité de la semence (**Batista et al., 2009**) par le billet du stress oxydatif responsable des dommages provoqués par le choc thermique. Ce phénomène provoque un appauvrissement significatif en cholestérol qui affecte l'intégrité de la membrane cellulaire, la motilité des gamètes et par conséquent la fertilité (**Ahmed et al., 2016**). La sensibilité des spermatozoïdes de mammifères au choc dû au froid dépend de la proportion du ratio cholestérol/phospholipides dans la membrane cellulaire. Chez le bélier, ce rapport est plus faible que chez le taureau, bouc et le sperme humain, ce qui explique la plus grande susceptibilité de la membrane du sperme de bélier au choc froid (**Muino-Blanco et al., 2008 ; Benhenia et al., 2016**).

Les processus de congélation du sperme visent à minimiser la perte de motilité et de viabilité des spermatozoïdes (**Dorado et al., 2010 ; Agarwal et al., 2014**).

Des agents cryoprotecteurs et des antioxydants (vitamine E, cholestérol, vitamine C ...) (**Benhenia et al., 2016; 2018**) sont ajoutés dans les dilueurs afin de protéger les spermatozoïdes durant la congélation. L'agent cryoprotecteur le plus efficace et le plus utilisé est le glycérol ; agent perméable, il peut donc pénétrer et diffuser à l'intérieur des cellules (**Holt, 2000**). Il abaisse la température de nucléation de l'eau à l'intérieur de la cellule, ce qui diminue les risques de formation de glace intracellulaire qui est létale pour les cellules.

De plus, le glycérol diminue la température à laquelle les membranes subissent un changement de phase (phase liquide-cristalline à phase gel) pendant le refroidissement. Le glycérol permet donc de conserver les membranes plus fluides jusqu'à des températures plus basses, diminuant ainsi le risque de cassure des membranes des spermatozoïdes causée par le choc dû au froid (**Ahmed et al., 2016**).

Chez l'espèce caprine, le taux de fertilité avec du sperme congelé varie entre 50 et 60%, en raison de la particularité anatomique de l'appareil génitale, où le sperme atteint facilement l'utérus. La congélation du sperme de bélier et de bouc est similaire, en ce qui concerne le type de dilueur, les cryoprotecteurs, taux de dilution et les protocoles congélation (**Salamon et Maxwell, 1995 ; Salamon et Maxwell, 2000 ; Ahmed et al., 2016**).

Les concentrations de sperme utilisées pour la cryoconservation chez les deux espèces varie entre 80 et 500×10^6 spz/ml (**Ritar *et al*, 1990**). En outre, chez les petits ruminants, des variations individuelles de la qualité du sperme congelé ont été observées, suggérant des différences spécifiques dans la sensibilité du sperme aux méthodes de congélation (**Barbas et Mascarenhas, 2009**).



Conclusion générale et Recommandations

Conclusion générale et Recommandations

Notre projet de thèse est de contribuer à déterminer les particularités des espèces dans le domaine de récolte, d'analyse et de conservation du sperme épидидymaire ; et ce dans un souci de son utilisation à long terme.

En premier lieu notre étude nous a permis d'évaluer des méthodes de récolte et de conservation in situ et ex situ (cryoconservation) de sperme épидидymaire qui pourrait être utilisé comme technique terminale, pour préserver au moins les animaux qui sont menacés de disparition, dans un but d'obtenir directement des spermatozoïdes féconds pour la réalisation des différentes techniques de reproduction assistée comme l'insémination artificielle (IA), la fécondation in vitro (IVF), et l'injection intracytoplasmique (ICSI) pour la production des progéniteurs.

Il est très important de savoir qu'il est possible d'utiliser la réserve génétique d'un animal même après sa mort. Cela permet d'éviter les pertes de gamète suivi par la disparition précoce du potentiel reproductif d'un mâle d'une valeur génétique importante. L'application de cette biotechnologie doit être proposée par le vétérinaire au moment du décès d'un animal de grande valeur. Le propriétaire de l'animal doit savoir qu'il est encore possible d'obtenir les derniers descendants.

Cette étude nous a permis de faire ressortir les points suivants :

- Chez le coq fermier, il a été conclu que la bonne qualité des spermatozoïdes pourrait être recueillie à partir du canal déférent contrairement aux mammifères au niveau du canal épидидymaire.
- La meilleure méthode de récolte du sperme après abattage chez le coq est la rétrograde (rinçage), les résultats de cette méthode sont presque deux fois plus supérieurs que la méthode flot-up et la macération. Méthode simple, fiable, moins traumatisante et moins toxique à utiliser pour la récolte du sperme destiné à la cryoconservation du sperme.
- Il est possible de réaliser une conservation in situ du sperme de coqs de population locale algérienne à 4 °c et 20 °c pendant 24 heures afin de récupérer la semence lorsque les conditions et les moyens sont disponibles.
- Pour l'espèce caprine la température ambiante et de réfrigération n'a pas influencé la qualité du sperme de bouc de la population locale après une conservation in situ et pendant 48h.
- Les spermatozoïdes récoltés des gonades conservées jusqu'à 48 h à la température de réfrigération, et pendant 24 h à température ambiante n'ont pas eu des effets néfastes lors de la cryoconservation, d'où la possibilité de ne pas récolter la semence directement après la mort de l'animal.
- Afin d'améliorer la motilité massale, la mobilité progressive, la viabilité, la fonctionnalité de la membrane, l'intégrité de l'acrosome et la peroxydation lipidique, en minimisant le stress oxydatif pendant la congélation du sperme épидидymaire chez la population bovine autochtone, le recours à la supplémentation des antioxydants comme la quercétine, le trolox, et l'acide tannique au diluant lors de la cryoconservation a donné des résultats satisfaisants

pour l'ensemble des antioxydants. Mais les meilleurs résultats sont observés avec la quercétine et le trolox.

- Comme première démarche pour la mise en place d'une banque génétique de sperme épидидymaire, 1879 doses de sperme, ont été conservées auprès d'un total de 41 donneurs de races locales (bovins, caprins, ovins, coqs).

L'étape la plus importante pour la création d'une banque génétique à base de sperme consiste à établir ou à renforcer le programme de conservation ex situ représenté principalement par la cryoconservation. Les mesures de conservation ex situ constituent une assurance de secours contre les pertes de ressources génétiques animales sur terrain, que ce soit par l'érosion, soit à la suite de situations d'urgence.

La congélation du sperme est une méthode rentable pour préserver les animaux ; le choix du matériel à stocker doit être précédé d'une planification minutieuse et d'une optimisation des contributions génétiques, le stockage du sperme pourrait être une stratégie (rentable) pour rétablir une race.

La cryoconservation du sperme épидидymaire a beaucoup à gagner à être développée dans le cadre d'un programme national pour la conservation des ressources génétiques. Il y a toujours un besoin de financement national ou public ou conjoint pour des objectifs à long terme.

Les cryobanques exigent une documentation complète sur leur contenu, les donneurs et les procédures de congélation. Un système de base de données pour la gestion de toutes ces informations doit être mis en place dans le cadre réglementaire d'un programme de cryoconservation.

Sauvegarder le matériel génétique important pour la recherche scientifique, pour l'avancement des connaissances et pour le bénéfice de l'humanité ; diffuser des informations sur la crise d'extinction actuelle, ses conséquences pour la biodiversité génétique de la planète et sur la manière dont la gestion génétique des espèces menacées peut contribuer à leur lutte pour la survie. Comme dans le monde entier, le projet de cryobanque à base de sperme épидидymaire est promu, mais la démarche pour sa concrétisation impose certaines recommandations :

- Revoir la réglementation nationale avant toute démarche de création d'une banque génétique.
- L'installation de tout le matériel nécessaire à la récolte, l'analyse et la conservation.
- Un contrôle sanitaire obligatoire du matériel génétique avant la conservation.
- Plus de tentative de cryoconservation pour d'autres espèces comme le dromadaire, l'abeille, les espèces sauvages menacées de disparition (cerf de barbarie, l'hyène rayée, mangouste, genette...)

Différentes façons d'organiser la cryoconservation, en fonction du rôle et des responsabilités des parties prenantes.

L'implication étroite des éleveurs, des associations d'éleveurs et des centres d'insémination artificielle (IA) dans l'établissement de liens entre les programmes de cryoconservation et les opérations d'insémination artificielle de routine constitue le facteur le plus important pour l'efficacité des programmes. La collaboration entre les parties prenantes et qui doit être confirmée par des contrats.

Le stockage et l'utilisation à long terme du matériel cryopréservé nécessitent des mesures de sécurité et d'hygiène. La sécurité du stockage doit être garantie par la duplication des sites de stockage et la surveillance continue des conditions de stockage.

Un cadre réglementaire national doit être mis, visant à contrôler les risques sanitaires (avec des moyens faciles d'utilisation) tout en facilitant la collecte flexible (en particulier au niveau des abattoirs et aussi auprès des éleveurs possédant des individus à effectif national réduit et fournir un portail où l'on peut accéder à des informations sur les échantillons déjà stockés et disponibles et où des conseils sur les bio banques pour les espèces menacées sont fournis. Pour cela la création d'un réseau national doit voir le jour.

Les cryobanques exigent une documentation complète sur leur contenu, les donneurs et les procédures de congélation. Un système de base de données pour la gestion de toutes ces informations doit être mis en place dans le cadre réglementaire d'un programme de cryoconservation.

Dans les centres d'examen de la semence, les méthodes utilisées ne sont pas complètement standardisées malgré les recommandations de l'Organisation Mondiale de la santé. En effet, le guide de l'OMS recommande plusieurs techniques pour certaines étapes d'examen du sperme (par exemple plusieurs colorations sont possibles pour l'examen morphologique, car aucune des techniques proposées n'a montré de supériorité par rapport à une autre).

Afin d'améliorer la méthode de cryoconservation du sperme épидидymaire en prenant en considération les particularités anatomiques et physiologiques des espèces conservées :

- Revoir la composition des dilueurs de congélation ;
- Revoir la concentration de glycérol et son mode d'adjonction ;
- Revoir la durée du temps d'équilibration avant congélation ;
- Revoir les conditions de refroidissement de la semence selon l'espèce.

Actuellement les recherches scientifiques sont focalisées sur la recherche du meilleur antioxydant avec différente dose et selon l'espèce.

Le recours à d'autres méthodes de conservation à long terme comme la «VITRIFICATION» ou la surgélation éclair, qui est la transformation de l'état liquide à l'état solide sans formation de cristaux. Le processus et la mécanique de la vitrification sont similaires à la congélation lente, la différence résidant dans la concentration du milieu. La méthode de vitrification applique un milieu sélectionné qui a une concentration plus élevée de soluté de sorte que l'eau quitte les cellules par osmose.

La cryobanque c'est aussi la cryoconservation du sperme éjaculé, des ovocytes et des embryons.

*R*éférences

Bibliographiques



Références bibliographiques

1. **Abdelguerfi, A., & Laouar, M. (1999).** Les ressources génétiques en Algérie : un préalable à la sécurité alimentaire et au développement durable. *INESG (Alger)*, 1-108.
2. **Abdelguerfi A. Ramdane S.A. (2003).** Bilans des Expertises sur « Menaces pesant sur la diversité biologique » MATE-GEF/PNUD Projet ALG97/G31.
3. **Abdel-Khalek, A. E., El-Harairy, M. A., Shamiah, S. M., El-Hamd, A., & Khalil, W. A. (2009).** Some physical characteristics and response to hypo-osmolality levels of epididymal camel spermatozoa stored AT 25 OR 5oC. *Journal of Animal and Poultry Production*, **34**(8), 8657-8666.
4. **Abd-Elmaksoud, A., Shoeib, M. B., & Marei, H. E. (2014).** Localization of S-100 proteins in the testis and epididymis of poultry and rabbits. *Anatomy & cell biology*, **47**(3), 180-187.
5. **Abdulkadim Al-Ebrahimi, H., & Al-Sultani, Y. K. (2015).** Sperm Chromatin Maturity Assay by Aniline Blue Dye and its Correlation with The Result of Intracytoplasmic Sperm Injection. *Medical Journal of Babylon*, **12**(1).
6. **Abu, A. H., Kisani, A. I., & Ahemen, T. (2016).** Evaluation of sperm recovered after slaughter from cauda epididymides of red Sokoto bucks. *Veterinary world*, **9**(12), 1440.1444.
7. **Afri-Bouzebda, F., Lamraoui, R., Bouzebda, Z., Chacha, F., & Gherissi, D. E. (2015).** Effects of GnRH or HCG on ovarian response in PMSG-superovulated Ouled Djellal ewes (Algeria). *Global Veterinaria*, **15**(5), 498-505.
8. **Afri-Bouzebda. (1985).** Transplantation embryonnaire chez la brebis. Maîtrise en Sciences Vétérinaires. Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon. 1985.
9. **Ahmed, H., Andrabi, S. M. H., & Jahan, S. (2016).** Semen quality parameters as fertility predictors of water buffalo bull spermatozoa during low-breeding season. *Theriogenology*, **86**(6), 1516-1522.
10. **Ahmed, H., Andrabi, S. M. H., Anwar, M., & Jahan, S. (2017).** Use of post-thaw semen quality parameters to predict fertility of water buffalo (*Bubalus bubalis*) bull during peak breeding season. *Andrologia*, **49**(4), e12639.
11. **Ahmed, T., Islam, R., Lone, F. A., & Malik, A. A. (2016).** Effect of washing on the post-thaw quality of cryopreserved ram epididymal spermatozoa. *Veterinary world*, **9**(5), 519-523.
12. **Aitken, R. J. (2017).** Reactive oxygen species as mediators of sperm capacitation and pathological damage. *Molecular reproduction and development*, **84**(10), 1039-1052.

13. Akhlaghi, A., Ahangari, Y. J., Zhandi, M., & Peebles, E. D. (2014). Reproductive performance, semen quality, and fatty acid profile of spermatozoa in senescent broiler breeder roosters as enhanced by the long-term feeding of dried apple pomace. *Animal reproduction science*, *147*(1-2), 64-73.
14. Akhoondi, M., Oldenhof, H., Stoll, C., Sieme, H., & Wolkers, W. F. (2011). Membrane hydraulic permeability changes during cooling of mammalian cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, *1808*(3), 642-648.
15. Alapati, R., Stout, M., Saenz, J., Gentry Jr, G. T., Godke, R. A., & Devireddy, R. V. (2009). Comparison of the permeability properties and post-thaw motility of ejaculated and epididymal bovine spermatozoa. *Cryobiology*, *59*(2), 164-170.
16. Ali, F., Rebia, A. (2008). Le Patrimoine génétique animal en Algérie. Inventaire et état de conservation. DOI: 10.13140/RG.2.2.30073.57443.
17. Almeida, D., Lima, J. S., Leão, D. L., Oliveira, K. G., Santos, R. R., Domingues, S., & Miranda, M. S. (2018). The effects of Trolox on the quality of sperm from captive squirrel monkey during liquefaction in the extender ACP-118™. *Zygote (Cambridge, England)*, *26*(4), 333–335. <https://doi.org/10.1017/S096719941800028X>.
18. Alvarez, J. G., & Storey, B. T. (1992). Evidence for increased lipid peroxidative damage and loss of superoxide dismutase activity as a mode of sublethal cryodamage to human sperm during cryopreservation. *Journal of Andrology*, *13*(3), 232-241.
19. Amann, R. P., & Almquist, J. O. (1962). Reproductive capacity of dairy bulls. VIII. Direct and indirect measurement of testicular sperm production. *Journal of Dairy Science*, *45*(6), 774-781.
20. Amann, R. P., & Waberski, D. (2014). Computer-assisted sperm analysis (CASA): capabilities and potential developments. *Theriogenology*, *81*(1), 5-17.
21. Amann, R. P., Seidel Jr, G. E., & Mortimer, R. G. (2000). Fertilizing potential in vitro of semen from young beef bulls containing a high or low percentage of sperm with a proximal droplet. *Theriogenology*, *54*(9), 1499-1515.
22. Amaral, A., Lourenço, B., Marques, M., & Ramalho-Santos, J. (2013). Mitochondria functionality and sperm quality. *Reproduction*, *146*(5), 163-174.
23. Anzar, M., Rajapaksha, K., & Boswall, L. (2019). Egg yolk-free cryopreservation of bull semen. *PloS one*, *14*(10), e0223977.
24. Aravindakshan, M., Chauhan, P. S., & Sundaram, K. (1985). Studies on germinal effects of quercetin, a naturally occurring flavonoid. *Mutation Research Letters*, *144*(2), 99-106.
25. Arnold, C.K.J. (2004). *La reproduction du Guépard et du lion*. Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort. Thèse pour le doctorat vétérinaire présentée et soutenue publiquement devant la faculté de médecine de Créteil, pp 47.
26. Artoisenet, P., Johanne, D., & Charles, D. (2008). Dessaisonnement de moutons laitiers par traitement lumineux, Compte rendu d'un essai mené en ferme, *Filière Ovine et Caprine*, *23*, 3-8.

27. Avdatek, F., & Gündoğan, M. (2019). Influence of trolox and alpha-lipoic acid on post-thawed pırlak ram sperm parameters, oxidative stress and DNA damage in non-breeding season. *Kocatepe Veterinary Journal*, *12*(3), 363-369.
28. Avdatek, F., Yeni, D., İnanç, M. E., Çil, B., Tuncer, B. P., Türkmen, R., & Taşdemir, U. (2018). Supplementation of quercetin for advanced DNA integrity in bull semen cryopreservation. *Andrologia*, *50*(4), e12975.
29. Awad, H. M., Boersma, M. G., Boeren, S., van der Woude, H., van Zanden, J., van Bladeren, P. J., ... & Rietjens, I. M. (2002). Identification of o-quinone/quinone methide metabolites of quercetin in a cellular in vitro system. *FEBS letters*, *520*(1-3), 30-34.
30. Axné, E. (2006). Sperm maturation in the domestic cat. *Theriogenology*, *66*(1), 14-24.
31. Bagirov, V. A., Nasibov, S. N., Klenovitskii, P. M., Lesin, S. A., Voevodin, V. A., Zinov'eva, N. A., ... & Soloshenko, V. A. (2009). Animal gene pool preservation and conservation. *Russian Agricultural Sciences*, *35*(2), 112-115.
32. Bagley, C. V. (1997). Breeding Soundness in Rams: How to Do It and How to Interpret It. *AH/Sheep*, *13*, 1.
33. Bakst, M.R., Howarth, B.J. (1977). Hydrolysis of the hen's perivitellin layer by cock sperm in vitro. *Biol Reprod*. *17*:370 –9.
34. Ball, B. A. (2008). Oxidative stress, osmotic stress and apoptosis: impacts on sperm function and preservation in the horse. *Animal reproduction science*, *107*(3-4), 257-267.
35. Bansal, A. K., & Bilaspuri, G. S. (2010). Impacts of oxidative stress and antioxidants on semen functions. *Veterinary medicine international*, *2010*, 686137. <https://doi.org/10.4061/2011/686137>
36. Barati, F., Khaskari, M. M., & Mohammadi, G. A. (2009). Cryopreservation of in situ cool stored buffalo (*Bubalus bubalis*) epididymal sperm. *Iranian Journal of Veterinary Research, Shiraz University*, *10* (4- 29), 339.
37. Baril, G., Chemineau, P., & Cognie, Y. (1993). *Manuel de formation pour l'insémination artificielle chez les ovins et les caprins*, 83 (4-20).
38. Barua, A., & Yoshimura, Y. (1997). Rural poultry keeping in Bangladesh. *World's Poultry Science Journal*, *53*(4), 387-394.
39. Bath, G. S., & Chaudhari, S. U. R. (2002). Sperm reserves and its relationship to parameters of the testis, epididymis and vas deferens of local cocks in the Sahel region of Nigeria. *Intern. J. Agric. Biol*, *4*, 561-564.
40. Batista, M., Nino, T., Alamo, D., Castro, N., Santana, M., Gonzalez, F. & Gracia, A. (2009). Successful artificial insemination using semen frozen and stored by an ultrafreezer in the Majorera goat breed. *Theriogenology*, *71*(8), 1307-1315.
41. Baumber, J., Ball, B. A., & Linfor, J. J. (2005). Assessment of the cryopreservation of equine spermatozoa in the presence of enzyme scavengers and antioxidants. *American Journal of Veterinary Research*, *66*(5), 772-779.

42. **Belkhiri Y. (2019).** *Analyse des variations des paramètres spermatiques chez les Béliers de "Race" Ouled Djelal destinés à l'insémination ovine.* Thèse de doctorat en sciences vétérinaires. Université de Souk Ahras, p (90-110).
43. **Belkhiri, Y. (2011).** *Insémination artificielle ovine en Algérie,* centre universitaire d'El-Tarf - Institut des sciences vétérinaires. Mémoire présenté pour l'obtention du diplôme de Magister En Médecine Vétérinaire, Spécialité Zootechnie, p (168-170).
44. **Belkhiri, Y., Bouzebda-Afri, F., Bouzebda, Z., & Mouffok, C. (2017).** Age and season effects on sexual parameters in mature rams used in artificial insemination center (Algeria). *Global Veterinaria*, **18**(1), 31-40.
45. **Beltran M.A.G. (2011).** Cryopreservation of goat semen for A.I. Knowledge Resource Management Center, Philippine Carabao Center, pp 44.
46. **Ben Abdallah, F., Zribi, N., & Ammar-Keskes, L. (2011).** Antioxidative potential of Quercetin against hydrogen peroxide induced oxidative stress in spermatozoa in vitro. *Andrologia*, **43**(4), 261-265.
47. **Benhenia, K., Lamara, A., Fatmi, S., & Iguer-Ouada, M. (2016).** Effect of cyclodextrins, cholesterol and vitamin E and their complexation on cryopreserved epididymal ram semen. *Small Ruminant Research*, **141**, 29-35.
48. **Benhenia, K., Rahab, H., Smadi, M. A., Benmakhlouf, H., Lamara, A., Idres, T., & Iguer-Ouada, M. (2018).** Beneficial and harmful effects of cyclodextrin-vitamin E complex on cryopreserved ram sperm. *Animal reproduction science*, **195**, 266-273.
49. **Berby, B. (2017).** *Étude de l'impact du stress oxydant sur le noyau spermatique humain.* Médecine humaine et pathologie. Mémoire valant lieu de thèse pour l'obtention du titre de docteur en médecine et du diplôme d'études spécialisées en biologie médicale. Université de rouen, faculté mixte de médecine et de pharmacie pp 82.
50. **Bergstein-Galan, T. G., Weiss, R. R., Bertol, M. A. F., Abreu, A. C. M., Busato, E., Kozicki, L. E., & Bicudo, S. D. (2017).** Quality and fertility of frozen ovine spermatozoa from epididymides stored at room temperature (18–25° C) for up to 48 h post mortem. *Theriogenology*, **96**, 69-75.
51. **Bergstein-Galan, T. G., Weiss, R. R., Kozicki, L. E., & Bicudo, S. D. (2017).** Sperm subpopulations in ejaculated sperm and spermatozoa recovered from ovine epididymides up to 48 h after death. *Animal reproduction science*, **187**, 20-27.
52. **Bernard Robaire, Barry T. Hinton, and Marie-Claire Orgebin-Crist. (2006).** The Epididymis. Knobil and Neill's Physiology of Reproduction, Third Edition edited by Jimmy D. Neill, Elsevier © 2006.
53. **Bertol, M. A. (2016).** Cryopreservation of epididymal sperm. *Cryopreservation in eukaryotes'.* (Eds F Marco-Jiménez, H Akdemir) pp, 121-135.
54. **Bertol, M. A. F., Weiss, R. R., Thomaz-Soccol, V., Kozicki, L. E., Fujita, A. S., Abreu, R. A. D., & Green, K. T. (2013).** Viability of bull spermatozoa collected from the epididymis stored at 18-20 C. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, **56**(5), 777-783.

- 55. Bester, N. (2006).** Effect of different dietary energy levels on productive and reproductive traits in Dorper rams, submitted in partial fulfillment of requirements for the degree, Magister Scientiae Agriculturae to the Faculty of Agriculture. Department of Animal, Wildlife and Grassland Sciences University of the Free State Bloemfontein May, 2006, *Animal Reproduction Science*. p (114–123).
- 56. Bilodeau, J. F., Chatterjee, S., Sirard, M. A., & Gagnon, C. (2000).** Levels of antioxidant defenses are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research*, *55*(3), 282-288.
- 57. Bisimwa, N. P., Ayagirwe, B. R., Lugamba, R. T., Wasso, S. D., Aksanti, B. C., & Bisimwa, B. E. (2019).** Le système de production de la poule locale contraint son développement au Sud-Kivu, Est de la République Démocratique du Congo. *Journal of Applied Biosciences*, *135*, 13821-13830.
- 58. Bissett, C., & Bernard, R. T. F. (2005).** The effect of prolonged cold storage of eland (*Taurotragus oryx*) cauda epididymides on the spermatozoa: possible implications for the conservation of biodiversity. *Theriogenology*, *63*(6), 1592-1604.
- 59. Bister, J.L. (2009).** La reproduction du mouton; Le système reproducteur du bélier, *Laboratoire de Physiologie animale*, FUNDP CRO.
- 60. Biswas, J., Chakrabarti, A., De, A., Pal, M., Das, U. S., Saha, K., ... & Pan, S. (2016).** Minimum Number of Sex-Sorted Frozen Sperm per Dose in Sahiwal (*Bos indicus*) Cattle. *Adv. Anim. Vet. Sci*, *4*(12), 613-618.
- 61. Blackburn, H. D. (2003).** Development of national animal genetic resource programs. *Reproduction, Fertility and Development*, *16*(2), 27-32.
- 62. Blanco, J. M., Gee, G. F., Wildt, D. E., & Donoghue, A. M. (2002).** Producing progeny from endangered birds of prey: treatment of urine-contaminated semen and anovel intramaginal insemination approach. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, *33*(1), 1-7.
- 63. Blash, S., Melican, D., & Gavin, W. (2000).** Cryopreservation of epididymal sperm obtained at necropsy from goats. *Theriogenology*, *54*(6), 899-905.
- 64. Blesbois, E. (2007).** Current status in avian semen cryopreservation. *World's Poultry Science Journal*, *63*(2), 213-222.
- 65. Blesbois, E. (2011).** Gamètes et fécondation chez les oiseaux. *INRA Productions Animales*, *24*(3), 259-272.
- 66. Blesbois, E. (2018).** Bird Reproduction Overview. In *Encyclopedia of Reproduction; Skinner, M.K., Ed.; Academic Press: Cambridge, MA, USA*, 6, 579–585.
- 67. Blesbois, E., & Brillard, J. P. (2007).** Specific features of in vivo and in vitro sperm storage in birds. *Animal: an international journal of animal bioscience*, *1*(10), 1472–1481. <https://doi.org/10.1017/S175173110700081X>.
- 68. Boediono, A. (2004).** Preservation of Garut Rams Spermatozoon as a Source of Male Germ Plasm. *BIOTROPIA-The Southeast Asian Journal of Tropical Biology*, (**23**). (40 – 46).

69. **Boettcher, P. J., Stella, A., Pizzi, F., & Gandini, G. (2005).** The combined use of embryos and semen for cryogenic conservation of mammalian livestock genetic resources. *Genetics Selection Evolution*, **37**(6), 657-675.
70. **Boitrelle, F. (2014).** *Liens entre la morphologie et les marques épigénétiques, la qualité de l'ADN, le contenu chromosomique et les capacités fécondantes du spermatozoïde humain* (Doctoral dissertation, Université de Versailles-Saint Quentin en Yvelines). P66.
71. **Boland, M. P., Al-Kamali, A. A., Crosby, T. F., Haynes, N. B., Howles, C. M., Kelleher, D. L., & Gordon, I. (1985).** The influence of breed, season and photoperiod on semen characteristics, testicular size, libido and plasma hormone concentrations in rams. *Animal Reproduction Science*, **9**(3), 241-252.
72. **Boly, H. (1986).** La récolte du sperme chez le babouin (*papio papio*) par la technique d'électro éjaculation, thèse présentée pour obtenir le grade de docteur vétérinaire (diplôme d'état) , faculté de médecine et de pharmacie de Dakar- université de Dakar- Ecole Inter-Etats des Sciences et Médecine Vétérinaire (E.I.S.M.V) ,N°11,p(24-28).
73. **Bonnes, G., Desclaude, J., Drogoul, C., Gadoud, R., Jussiau, R., Le Loc'h, A., ... & Robin, G. (1988).** reproduction des mammifères d'élevage. *Editions Foucher*.
74. **Boots, A. W., Haenen, G. R., & Bast, A. (2008).** Health effects of quercetin: from antioxidant to nutraceutical. *European journal of pharmacology*, **585**(2-3), 325-337.
75. **Boucif, A., Azzi, N., Tainturier, D., & Niar, A. (2007).** Variations saisonnières des paramètres reproductifs chez les béliers de deux races locales algériennes. *Renc. Rech. Ruminants*, **14**, 308.
76. **Boujenane, I. (1999).** *Les ressources génétiques ovines au Maroc*. Actes éditions.
77. **Boujenane, I. (2005).** Small ruminant breeds of Morocco. *Characterization of small ruminant breeds in West Asia and North Africa*, **2**, 5-54.
78. **Brault, E., Castellier, C. (2009).** Pathologie des testicules et de l'épididyme du mâle, l'épididyme. https://theses.vet-alfort.fr/Th_multimedia/repro_ovicap/male/htm/testicules_epididymes/epidydimite/epididymite.htm
79. **Braun, J., Sakai, M., Hochi, S., & Oguri, N. (1994).** Preservation of ejaculated and epididymal stallion spermatozoa by cooling and freezing. *Theriogenology*, **41**(4), 809-818.
80. **Briffaut, A. S. (2007).** *Congélation de la semence canine: détermination de la combinaison optimale de quatre facteurs différents*, Thèse présentée pour obtenir le grade de docteur vétérinaire à l'université Claude-Bernard (médecine - pharmacie): Ecole nationale vétérinaire de Lyon. p (35-54).
81. **Britan, A. (2006).** *Développement, optimisation et utilisation d'un système cellulaire de l'épithélium épидидymaire murin: approches moléculaires* (Doctoral dissertation, Université Blaise Pascal-Clermont-Ferrand II; Université d'Auvergne-Clermont-Ferrand I).p(4-8).
82. **Brouwers, J. F., & Gadella, B. M. (2003).** In situ detection and localization of lipid peroxidation in individual bovine sperm cells. *Free Radical Biology and Medicine*, **35**(11), 1382-1391.

83. Bruce, E. E. (2009). Semen Evaluation. sur le site web : http://www.vetmed.lsu.edu/eiltslotus/theriogenology-5361/semen%20anal_22.htm
84. Brugère-Picoux, J., & Silim, A. (1992). Manuel de pathologie aviaire. Ecole Nationale Veterinaire d'Alfort, Maisons-Alfort (France). 37 - 42.
85. Bucak, M. N., Sariözkan, S., Tuncer, P. B., Ulutaş, P. A., & Akçadağ, H. İ. (2009). Effect of antioxidants on microscopic semen parameters, lipid peroxidation and antioxidant activities in Angora goat semen following cryopreservation. *Small Ruminant Research*, *81*(2-3), 90-95.
86. Bucak, M. N., Tuncer, P. B., Sariözkan, S., & Ulutaş, P. A. (2009). Comparison of the effects of glutamine and an amino acid solution on post-thawed ram sperm parameters, lipid peroxidation and anti-oxidant activities. *Small Ruminant Research*, *81*(1), 13-17.
87. Budras, K. D., & Sauer, T. (1975). Morphology of the epididymis of the cock (*Gallus domesticus*) and its effect upon the steroid sex hormone synthesis. *Anatomy and Embryology*, *148*(2), 175-196.
88. Buege, J. A., & Aust, S. D. (1978). [30] Microsomal lipid peroxidation. In *Methods in enzymology*, *52*, 302-310. Academic press.
89. Caballero, J. N., Frenette, G., & Sullivan, R. (2011). EPID-V: 5e Workshop International sur l'épididyme—28 octobre-1er novembre 2010, Sao Paulo, Brésil Posters sélectionnés pour présentations orales. *Andrologie*, *21*, 127-134.
90. Caballero, J., Frenette, G., & Sullivan, R. (2011). Post testicular sperm maturational changes in the bull: important role of the epididymosomes and prostasomes. *Veterinary medicine international*, 2011.
91. Cabannes, R.C. (2008). *Comparaison des méthodes d'évaluation de la qualité de la semence dans les espèces bovine, canine et humaine*, thèse : 03 – tou 3 – 4108 pour obtenir le grade de docteur vétérinaire diplôme d'état présentée et soutenue publiquement en 2008 devant l'université Paul-Sabatier de Toulouse, école national vétérinaire de Toulouse.pp(68).
92. Cadet, R. (2007) .Cours immunologie ; épididyme et maturation des spermatozoïdes, maitre de conférence – Université Blaise Pascal – Clermont-Ferrand.
93. Cameron, J. (2006). *Programme photopériodique appliqué à longueur d'année pour améliorer la répartition des mises bas et la productivité des brebis soumises à un rythme d'agnelage accéléré*, mémoire présenté à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval dans le cadre du programme de maîtrise en Sciences Animales pour l'obtention du grade de Maître ès Sciences (M. Sc.). Département de sciences animales, faculté des sciences de l'agriculture et de l'alimentation université Laval. p(56-89).
94. Carole, R. C. (2008). *Comparaison des méthodes d'évaluation de la qualité de la semence dans les espèces bovine, canine et humaine*, thèse pour obtenir le grade de docteur veterinaire diplome d'etat présentée et soutenue publiquement en 2008 devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse.

95. Cary, J. A., Madill, S., Farnsworth, K., Hayna, J. T., Duoos, L., & Fahning, M. L. (2004). A comparison of electroejaculation and epididymal sperm collection techniques in stallions. *The Canadian Veterinary Journal*, *45*(1), 35-41.
96. Castellini, C., Dal Bosco, A., Mugnai, C., & Pedrazzoli, M. (2006). Comparison of two chicken genotypes organically reared: oxidative stability and other qualitative traits of the meat. *Italian Journal of Animal Science*, *5*(1), 29-42.
97. Chandler, J. E., Adkinson, R. M., Hay, G. M., & Crain, R. L. (1985). Environmental and genetic sources of variation for seminal quality in mature Holstein bulls. *Journal of dairy science*, *68*(5), 1270-1279.
98. Chatiza, F. P., Bartels, P., Nedambale, T. L., & Wagenaar, G. M. (2012). Computer assisted sperm analysis of motility patterns of postthawed epididymal spermatozoa of springbok (*Antidorcas marsupialis*), impala (*Aepyceros melampus*), and blesbok (*Damaliscus dorcus phillipsi*) incubated under conditions supporting domestic cattle in vitro fertilization. *Theriogenology*, *78*(2), 402-414.
99. Chaveiro, A., Cerqueira, C., Silva, J., Franco, J., & da Silva, F. M. (2015). Evaluation of frozen thawed cauda epididymal sperms and in vitro fertilizing potential of bovine sperm collected from the cauda epididymal. *Iranian Journal of Veterinary Research*, *16*(2), 188-193.
100. Cheema, R. S., Bansal, A. K., Bilaspuri, G. S., & Gandotra, V. K. (2011). Correlation between the proteins and protein profile (s) of different regions of epididymis and their contents in goat buck. *Animal Science Papers and Reports*, *29*(1).
101. Chelmonska, B., Jerysz, A., Lukaszewicz, E., Kowalczyk, A., & Malecki, I. (2008). Semen collection from Japanese quail (*Coturnix japonica*) using a teaser female. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, *32*(1), 19-24.
102. Chen, H., Chow, P. H., Cheng, S. K., Cheung, A. L., Cheng, L. Y., & O, W. S. (2003). Male genital tract antioxidant enzymes: their source, function in the female, and ability to preserve sperm DNA integrity in the golden hamster. *Journal of andrology*, *24*(5), 704-711.
103. Chevrier, C., & Dacheux, J. L. (1988). Maturation des spermatozoïdes de bélier. Etude préliminaire du mouvement flagellaire caractéristique des formes de transition du corps de l'épididyme. *Reproduction Nutrition Développement*, *28*(5), 1301-1305.
104. Chimi, H., Cillard, J., Cillard, P., & Rahmani, M. (1991). Peroxyl and hydroxyl radical scavenging activity of some natural phenolic antioxidants. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, *68*(5), 307-312.
105. Churchil, R. R., Praveena, P. E., & Sharma, D. (2014). Semen quality parameters, their inter-relationship and post-washing sperm attributes of Rhode Island Red roosters. *Veterinary World*, *7*(12).
106. Clarke, R. N., Sexton, T. J., & Ottinger, M. A. (1982). Effects of holding temperature and storage time on respiratory rate, motility, and fertility of chicken and turkey semen. *Poultry Science*, *61*(9), 1912-1917.

107. **Clulow, J., & Jones, R. C. (1982).** Production, transport, maturation, storage and survival of spermatozoa in the male Japanese quail, *Coturnix coturnix*. *Reproduction*, **64**(2), 259-266.
108. **Clulow, J., & Jones, R. C. (1988).** Studies of fluid and spermatozoal transport in the extratesticular genital ducts of the Japanese quail. *Journal of Anatomy*, **157**, 1-11.
109. **Colas, G., & Guerin, Y. (1980).** Variations saisonnières de la qualité du sperme chez le bélier Ile-de-France. I. Etude de la morphologie cellulaire et de la motilité massale. *Reproduction Nutrition Développement*, **20**(6), 1789-1799.
110. **Colas, G., Lefebvre, J., & Guerin, J. (1988).** Recherche d'une prévision précoce de l'amplitude des variations saisonnières du diamètre testiculaire et du pourcentage de spermatozoïdes anormaux chez le bélier Ile-de-France. 1. Animaux nés en février. *Reproduction Nutrition Développement*, **28**(3A), 589-601.
111. **Coletto, Z. Congelação de sêmen da espécie canina adicionando antioxidantes. 2006. 103p** (Doctoral dissertation, Tese (Doutorado em Ciência Veterinária)–Universidade Federal Rural de Pernambuco, Pernambuco. Disponível em http://www.tede.ufrpe.br/tde_busca/arquivo.php).
112. **Cornwall, G. A. (2009).** New insights into epididymal biology and function. *Human reproduction update*, **15**(2), 213-227.
113. **Courot, M., & Volland-Nail, P. (1991).** Conduite de la reproduction des mammifères domestiques: présent et futur. *Productions Animales*, **4**(1), 21-29.
114. **Cunha, A. T. M., Carvalho, J. O., Kussano, N. R., Martins, C. F., Mourao, G. B., & Dode, M. A. N. (2016).** Bovine epididymal spermatozoa: Resistance to cryopreservation and binding ability to oviductal cells. *Cryobiology*, **73**(3), 348-355.
115. **Cutler, S. J., Fooks, A. R., & Van der Poel, W. H. (2010).** Public health threat of new, reemerging, and neglected zoonoses in the industrialized world. *Emerging infectious diseases*, **16**(1), 1.
116. **Dacheux, J. L., & Dacheux, F. (2014).** New insights into epididymal function in relation to sperm maturation. *Reproduction*, **147**(2), 27-42.
117. **Dacheux, J. L., & Paquignon, M. (1987).** Maturation epididymale des spermatozoïdes, influence sur la qualité des gamètes. *Journées rech. porcine en France*, **19**, 99-106.
118. **Dacheux, J. L., Belleannée, C., Jones, R., Labas, V., Belghazi, M., Guyonnet, B., ... & Dacheux, F. (2009).** Mammalian epididymal proteome. *Molecular and cellular endocrinology*, **306**(1-2), 45-50.
119. **Das, S. K., Rahman, M. M., Bhuiyan, M. M. U., Begum, N., & Bari, F. Y. (2016).** Effect of diluents and preservation on time native cock semen. *International Journal of Veterinary Science*, **5**(2), 51-57.
120. **Datta, U., Sekar, M. C., Hembram, M. L., & Dasgupta, R. (2009).** Development of a new method to preserve caprine cauda epididymal spermatozoa in-situ at -10 C with electrolyte free medium. *Journal of assisted reproduction and genetics*, **26**(8), 467-473.

121. **David, A.S. (2006).** *Conditions de développement de l'insemination artificielle dans les élevages petits ruminants du Nordeste du Brésil*, mémoire de fin d'étude présenté pour l'obtention du diplôme de master agronomie et agro-alimentaire spécialisation : productions animales en régions chaudes, université fédérale du Céara, p (13-43).
122. **De Jonge, C. J., Mack, S. R., & Zaneveld, L. J. D. (1989).** Inhibition of the human sperm acrosome reaction by proteinase inhibitors. *Gamete research*, **23**(4), 387-397.
123. **De Marchi, M., Cassandro, M., Targhetta, C., Baruchello, M., & Notter, D. R. (2005).** Conservation of poultry genetic resource in the Veneto region of Italy. *Animal Genetic Resources/Resources génétiques animales/Recursos genéticos animales*, **37**, 63-74.
124. **De Pauw, I., Van Soom, A., Verberckmoes, S. & de Kruif, A. (2000).** Bovine semen preservation under epididymal conditions and assessment of sperm quality by means of a spermoviduct binding assay. *Adapted from Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift*, **69**, 159-167.
125. **De Royer, M. A. (2011).** *L'absence bilatérale des canaux déférents: revue de la littérature et étude d'une population de 108 patients au CHRU de Lille*. mémoire pour le diplôme d'études spécialisées de biologie médicale, p (92-94).
126. **De Souza, A. P. B., Schorr-Lenz, Â. M., Lucca, F., & Bustamante-Filho, I. C. (2018).** The epididymis and its role on sperm quality and male fertility. *Animal Reproduction (AR)*, **14**(Supplement 1), 1234-1244.
127. **Dessie, T., Taye, T., Dana, N., Ayalew, W., & Hanotte, O. (2011).** Current state of knowledge on phenotypic characteristics of indigenous chickens in the tropics. *World's Poultry Science Journal*, **67**(3), 507-516.
128. **Desta, H. (2009).** Estimation of weight and age of sheep and goats. *Technical Bulletin 23. Ethiopia Sheep and Goat Productivity Improvement Program (ESGPIP)*.
129. **Djaout, A. (2018).** *contribution au génotypage de la population ovine d'Algérie*. Thèse de doctorat en sciences vétérinaires. Université de Souk Ahras.
130. **Dominguez Rebolledo, A., Navarrete Sierra, L., Cruz Tamayo, A., Aguiar Loria, A., Erosa Denis, S., Bolio Oses, R., ... & Ramon Ugalde, J. (2007).** Fertility in hair sheep inseminated with freeze spermatozoa rediluted with seminal plasma. *Revista Científica-Facultad De Ciencias Veterinarias*, **17**(1), 73-76.
131. **Domínguez-Rebolledo, Á. E., Fernández-Santos, M. R., Bisbal, A., Ros-Santaella, J. L., Ramón, M., Carmona, M., ... & Garde, J. J. (2010).** Improving the effect of incubation and oxidative stress on thawed spermatozoa from red deer by using different antioxidant treatments. *Reproduction, Fertility and Development*, **22**(5), 856-870.
132. **Domoslawska, A., & Zdunczyk, S. (2020).** Canine babesiosis—a disease rarely considered in the context of male infertility. *Irish Veterinary Journal*, **73**(1), 1-4.
133. **Dong, Q., Rodenburg, S. E., Huang, C., & Vandervoort, C. A. (2008).** Cryopreservation of rhesus monkey (*Macaca mulatta*) epididymal spermatozoa before and after refrigerated storage. *Journal of andrology*, **29**(3), 283-292.

134. **Donoghue, A. M., & Wishart, G. J. (2000).** Storage of poultry semen. *Animal reproduction science*, **62**(1-3), 213-232.
135. **Dorado, J., Munoz-Serrano, A., & Hidalgo, M. (2010).** The effect of cryopreservation on goat semen characteristics related to sperm freezability. *Animal reproduction science*, **121**(1-2), 115-123.
136. **Dott, H. M., Harrison, R. A. P., & Foster, G. C. A. (1979).** The maintenance of motility and the surface properties of epididymal spermatozoa from bull, rabbit and ram in homologous seminal and epididymal plasma. *Reproduction*, **55**(1), 113-124.
137. **Dowsett, K. F., & Knott, L. M. (1996).** The influence of age and breed on stallion semen. *Theriogenology*, **46**(3), 397-412.
138. **Dowsett, K. F., & Knott, L. M. (1996).** The influence of age and breed on stallion semen. *Theriogenology*, **46**(3), 397-412.
139. **Dravland, J. E., & Meizel, S. (1982).** The effect of inhibitors of trypsin and phospholipase A2 on the penetration of zona pellucida-free hamster eggs by acrosome-reacted hamster sperm. *Journal of Andrology*, **3**(6), 388-395.
140. **Drevet, J. (2012).** Mechanisms of mammalian post-testicular infertility, sur le site web: <http://www.gred-clermont.fr>.
141. **Dumasy, J.f., Donnay, I & Pebaret, P. (2011).** Bilan de la première phase de conservation des races ovines locales par la mise en place d'une cryo banque. *Filière ovine et caprine*, **36**
142. **Dumpala, P.R., Parker, H.M., & Mc Daniel, C.D. (2006).** The effect of semen storage temperature and diluent type on the sperm quality index of broiler breeder semen. *Int. J. Poult. Sci*, **5**: 838–845.
143. **Ehling, C., Rath, D., Struckmann, C., Frenzel, A., Schindler, L., & Niemann, H. (2006).** Utilization of frozen–thawed epididymal ram semen to preserve genetic diversity in Scrapie susceptible sheep breeds. *Theriogenology*, **66**(9), 2160-2164.
144. **El-Seadawy, I. E. S., El-Nattat, W. S., El-Tohamy, M. M., Aziza, S. A. H., El-Senousy, Y. A., & Hussein, A. S. (2017).** Preservability of rabbit semen after chilled storage in tris based extender enriched with different concentrations of Propolis ethanolic extract (PEE). *Asian Pacific Journal of Reproduction*, **6**(2), 68-76.
145. **Esponda, P., & Bedford, J. M. (1985).** Surface of the rooster spermatozoon changes in passing through the Wolffian duct. *Journal of Experimental Zoology*, **234**(3), 441-449.
146. **Etches, R. J. (1995).** *Reproduction in Poultry*. CAB international. Chap 12, 298-307.
147. **Evans, G. (1987).** Handling and examination of semen. *Salamon's artificial insemination of sheep and goats*, 93-106.
148. **Evans, G., & Maxwell, W. C. (1987).** *Salamons' artificial insemination of sheep and goats* (No. Ed. 2). Butterworths.

149. **Evemie, D. U. B. É., & Daniel, G. (2007).** Étude du rôle de la barrière hémato-épididymaire dans le maintien de la fertilité. *Bulletin de la Société zoologique de France*, *132*(1-2), 31-36.
150. **Falomo, M. E., Rossi, M., & Mantovani, R. (2016).** Collection, storage and freezability of equine epididymal spermatozoa. *Italian Journal of Animal Science*, *15*(3), 386-389.
151. **FAO. (2006).** La biodiversité des animaux de ferme, Interim report. Rome.
152. **FAO. (2005).** L'état Des Capacités Dans L A Gestion Des Ressources Zoogénétiques. Programmes de conservation
153. **FAO. (2007).** L'État des Ressources Zoogénétiques pour l'Alimentation et l'Agriculture dans le Monde –en bref, édité par Dafydd Pilling & Barbara Rischkowsky. Rome.
154. **FAO. (2008).** L'état des ressources zoogénétiques pour l'alimentation et l'agriculture dans le monde, édité par Barbara Rischkowsky et Dafydd Pilling. Rome.p497-499.
155. **FAO. (2010).** 6th Session of the intergovernmental technical working group on animal genetic resources for food and agriculture, Rome (Italy).92p.
156. **FAO. (2011).** Situation et évolution des biotechnologies appliquées à la conservation et à l'utilisation des ressources génétiques pour l'alimentation et l'agriculture, et questions pertinentes pour leur développement futur. Commission des ressources génétiques pour l'alimentation et l'agriculture. Treizième session ordinaire. Rome, 18-22 juillet 2011.
157. **FAO. (2012).** Cryoconservation of animal genetic resources food and agriculture organization of the United Nations. Rome, 2012.
158. **FAO. (2014).** Rapport national sur l'état de la biodiversité pour l'alimentation et l'agriculture en Algérie l'état de la biodiversité pour l'alimentation et l'agriculture en Algérie.
159. **FAO. (2018).** Status and Trends of Animal Genetic Resources–2018; Intergovernmental Technical Working Group on Animal Genetic Resources for Food and Agriculture; FAO: Rome, Italy, Available online: <http://www.fao.org/3/CA0121EN/ca0121en.pdf> (accessed on 20 August 2019).
160. **FAO. (2021).** World watch list for domestic animal diver- sity. 3rd Edition, B. Scheaf, Rome.
161. **FAO/UNEP (1995).**World watch list for domestic animal diversity, 2nd edition. B. Scherf (ed.). Food and Agriculture organisation of the United Nations, Rome.
162. **Farrell, P. B., Presicce, G. A., Brockett, C. C., & Foote, R. H. (1998).** Quantification of bull sperm characteristics measured by computer-assisted sperm analysis (CASA) and the relationship to fertility. *Theriogenology*, *49*(4), 871-879.
163. **Fernandez, C. D., Bellentani, F. F., Fernandes, G. S., Perobelli, J. E., Favareto, A. P. A., Nascimento, A. F., ... & Kempinas, W. D. (2011).** Diet-induced obesity in rats leads to a decrease in sperm motility. *Reproductive Biology and Endocrinology*, *9*(1), 1-10.

164. Fernández-Santos, M. D. R., Soler, A. J., Ramón, M., Ros-Santaella, J. L., Maroto-Morales, A., García-Álvarez, O., ... & Santiago-Moreno, J. (2011). Effect of post-mortem time on post-thaw characteristics of Spanish ibex (*Capra pyrenaica*) spermatozoa. *Animal reproduction science*, *129*(1-2), 56-66.
165. Feyisa, S. G., Park, Y. H., Kim, Y. M., Lee, B. R., Jung, K. M., Choi, S. B., ... & Han, J. Y. (2018). Morphological defects of sperm and their association with motility, fertility, and hatchability in four Korean native chicken breeds. *Asian-Australasian journal of animal sciences*, *31*(8), 1160-1168.
166. Fickel, J., Wagener, A., & Ludwig, A. (2007). Semen cryopreservation and the conservation of endangered species. *European Journal of Wildlife Research*, *53*(2), 81-89.
167. Flore, Lucette, Delphine Noel (2019). *caractérisation de la semence de chat domestique*, thèse pour le doctorat vétérinaire Présentée et soutenue publiquement devant la faculté de médecine de Créteil. école nationale vétérinaire d'Alfort.
168. Foote, R. H. (2002). Fertilizing ability of epididymal sperm from dead animals. *Journal of andrology*, *23*, 839-844.
169. Fotsa, J. C. (2008). *Caractérisation des populations de poules locales (Gallus gallus) au Cameroun* (Doctoral dissertation, Institut national agronomique Paris-Grignon).
170. Fouchécourt, S., Métayer, S., Locatelli, A., Dacheux, F., & Dacheux, J. L. (2000). Stallion epididymal fluid proteome: qualitative and quantitative characterization; secretion and dynamic changes of major proteins. *Biology of Reproduction*, *62*(6), 1790-1803.
171. François, D., Allain, D., Foulquié, D., Boissy, A., Jacquet, P., Moreno, C. R., ... & Bouix, J. (2010). Amélioration génétique de l'adaptation des Ovins aux milieux difficiles. *Renc. Rech. Rumin*, *17*, 439-442.
172. Frenette, G., Lessard, C., & Sullivan, R. (2002). Selected proteins of "prostasome-like particles" from epididymal cauda fluid are transferred to epididymal caput spermatozoa in bull. *Biology of reproduction*, *67*(1), 308-313.
173. Frenette, G., Lessard, C., Madore, E., Fortier, M. A., & Sullivan, R. (2003). Aldose reductase and macrophage migration inhibitory factor are associated with epididymosomes and spermatozoa in the bovine epididymis. *Biology of reproduction*, *69*(5), 1586-1592.
174. Froman, D. P., & Kirby, J. D. (2005). Sperm mobility: phenotype in roosters (*Gallus domesticus*) determined by mitochondrial function. *Biology of Reproduction*, *72*(3), 562-567.
175. Fuertes, P.V. (2008). *Congélation de la semence de chien préalablement réfrigérée: étude expérimentale*. thèse de la faculté de médecine de Créteil, Ecole nationale vétérinaire d'Alfort, p(12,18,25).
176. Fujihara, N., Koga, O., & Nishiyama, H. (1983). Secretory function of the ductus deferens of male chickens. *Poultry science*, *62*(3), 557-560.

177. **Gaëlle, D. (2000).** *Congelation de sperme de mammifères. application aux antilopes.* Thèse pour le diplôme d'état de docteur vétérinaire, Ecole nationale vétérinaire de Nantes. p (20-30 ; 67-86).
178. **Gandini, G., & Oldenbroek, K. (2007).** Strategies for moving from conservation to utilization.. *Utilisation and conservation of farm animal genetic resources.* Wageningen Academic Publishers. Wageningen, The Netherlands. pp 29-54.
179. **García-Álvarez, O., Maroto-Morales, A., Martínez-Pastor, F., Garde, J. J., Ramón, M., Fernández-Santos, M. D. R., ... & Soler, A. J. (2009).** Sperm characteristics and in vitro fertilization ability of thawed spermatozoa from Black Manchega ram: electroejaculation and postmortem collection. *Theriogenology*, **72**(2), 160-168.
180. **Garcia-Legname, M. (2010).** *Le spermatozoïde chirurgical : étude des facteurs corrélés aux résultats du prélèvement testiculaire chez 209 patients*, Thèse pour obtenir le grade de docteur en médecine. Université henri poincare, faculté de médecine de nancy., p (36-39).
181. **Garde, J. J., Ortiz, N., Garcia, A. J., Gallego, L., Landete-Castillejos, T., & Lopez, A. (1998).** Postmortem assessment of sperm characteristics of the red deer during the breeding season. *Archives of andrology*, **41**(3), 195-202.
182. **Gatti, J. L., Castella, S., Dacheux, F., Ecroyd, H., Métayer, S., Thimon, V., & Dacheux, J. L. (2004).** Post-testicular sperm environment and fertility. *Animal reproduction science*, **82**, 321-339.
183. **Gatti, J. L., Castella, S., Dacheux, F., Ecroyd, H., Métayer, S., Thimon, V., & Dacheux, J. L. (2004).** Post-testicular sperm environment and fertility. *Animal reproduction science*, **82**, 321-339.
184. **Gatti, J. L., Druart, X., Syntin, P., Guérin, Y., Dacheux, J. L., & Dacheux, F. (2000).** Biochemical characterization of two ram cauda epididymal maturation-dependent sperm glycoproteins. *Biology of reproduction*, **62**(4), 950-958.
185. **Gatti, J. L., Métayer, S., Belghazi, M., Dacheux, F., & Dacheux, J. L. (2005).** Identification, proteomic profiling, and origin of ram epididymal fluid exosome-like vesicles. *Biology of reproduction*, **72**(6), 1452-1465.
186. **Geneviève, M (2012).** *comparaison des techniques de cryoconservation de la semence chez le bouc et d'insémination artificielle chez lachèvre.* mémoire présenté à la faculté des études supérieures et postdoctorales de l'université laval dans le cadre du programme de maîtrise en sciences animales pour l'obtention du grade de Maître en sciences (M. Sc.) Département Des Sciences Animales Faculté D'agriculture De L'alimentation Et De La Consommation Université Laval Québec. pp 68.
187. **Ghosh, P.R., Sanyal, S., Bandopadhy, S., Basu, S. (1993).** The distribution of carnitine and sialic acid in different parts of epididymis of Black Bengal goat (*Capra hircus*). *Indian J. Anim. Reprod*, **14**,41.
188. **Gibb, Z., Butler, T. J., Morris, L. H. A., Maxwell, W. M. C., & Grupen, C. G. (2013).** Quercetin improves the postthaw characteristics of cryopreserved sex-sorted and nonsorted stallion sperm. *Theriogenology*, **79**(6), 1001-1009.

- 189. Gilmore, J. A., McGann, L. E., Ashworth, E., Acker, J. P., Raath, J. P., Bush, M., & Critser, J. K. (1998).** Fundamental cryobiology of selected African mammalian spermatozoa and its role in biodiversity preservation through the development of genome resource banking. *Animal reproduction science*, **53**(1-4), 277-297.
- 190. Girouard, J., Frenette, G., & Sullivan, R. (2011).** Comparative proteome and lipid profiles of bovine epididymosomes collected in the intraluminal compartment of the caput and cauda epididymidis. *International journal of andrology*, **34**(5pt2), e475-e486.
- 191. Givens, M. D. (2018).** Risks of disease transmission through semen in cattle. *Animal*, **12**(s1), s165-s171.
- 192. Glover, T. (2012).** *Mating males: an evolutionary perspective on mammalian reproduction*. Cambridge University Press.
- 193. González-Santos, J. A., Ávalos-Rodríguez, A., Martínez-García, J. A., Rosales-Torres, A. M., & Herrera-Barragán, J. A. (2019).** Sperm Morphophysiology in Different Sections of the Rooster Reproductive Tract. *International Journal of Morphology*, **37**(3),861-866.
- 194. Goovaerts, I. G. F., Hoflack, G. G., Van Soom, A., Dewulf, J., Nichi, M., de Kruif, A., & Bols, P. E. J. (2006).** Evaluation of epididymal semen quality using the Hamilton–Thorne analyser indicates variation between the two caudae epididymides of the same bull. *Theriogenology*, **66**(2), 323-330.
- 195. Grégory Rozières. (2018).** L'évolution spectaculaire du poulet en 60 ans témoigne de notre impact sur la nature SCIENCE,12/12/2018 11:06 CET | Actualisé 12/12/2018 11:09 CET <https://www.permaculturedesign.fr/evolution-poule-coq-origine-histoire-elevage-nature-oeuf/>
- 196. Grignard, E. (2005).** *Analyse de protéines spermatiques post-testiculaires et développement d'outils pour le contrôle de la fertilité de différents mammifères; Equus caballus, Bos taurus, Arvicola terrestris Scherman*, .Thèse présentée à l'université Blaise Pascal pour l'obtention du grade de docteur d'université (spécialité : biologie de la reproduction),p(9,24)
- 197. Groeneveld, L. F., Lenstra, J. A., Eding, H., Toro, M. A., Scherf, B., Pilling, D., ... & Globaldiv Consortium. (2010).** Genetic diversity in farm animals—a review. *Animal genetics*, **41**, 6-31.
- 198. Grossfeld, R., Sieg, B., Struckmann, C., Frenzel, A., Maxwell, W. M. C., & Rath, D. (2008).** New aspects of boar semen freezing strategies. *Theriogenology*, **70**(8), 1225-1233.
- 199. Guardia, T., Rotelli, A. E., Juarez, A. O., & Pelzer, L. E. (2001).** Anti-inflammatory properties of plant flavonoids. Effects of rutin, quercetin and hesperidin on adjuvant arthritis in rat. *Il farmaco*, **56**(9), 683-687.
- 200. Guérin, Y., Locatelli, Y., Comizolli, P., Mauget, R., Mermillod, P., Legendre, X., ... & Dacheux, J. L. (2003).** Conservation et utilisation du sperme épидидymaire d'ovins et de cervidés en insémination artificielle et fécondation in vitro. *Les actes du BRG*, **4**, 173-183.

- 201. Gueye, E. F. (2003).** Aviculture familiale et aviculture industrielle-Coopération au lieu de compétition. *Bulletin RIDAF*, **13**(2), 1-2.
- 202. Guillot, J. (2002).** *La calcification testiculaire chez les boucs de centres d'insémination artificielle: étude clinique et répercussion sur la production de semence.* Thèse pour obtenir le grade de docteur vétérinaire diplôme d'état présentée et soutenue publiquement en 2002 devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse, p (37-39).
- 203. Gunawan, M., Maheshwari, H., Rizal, M., & Boediono, A. (2010).** Quality of Epididymal and Ejaculated Sperms of Spotted Buffalo in Dextrose Supplemented Extender. *HAYATI Journal of Biosciences*, **17**(1), 27-30.
- 204. Gndoğan, M., & Demirci, E. (2003).** Monthly changes in some reproductive parameters and in testosterone and thyroxine values of rams throughout one year under continental climate conditions. *DTW. Deutsche Tierärztliche Wochenschrift*, **110**(11), 450-453.
- 205. Gunn, M. R., Champion, Z., Casey, M. E., Teal, P., & Casey, P. J. (2008).** Testicular and spermatozoan parameters in the pukeko (*Porphyrio porphyrio melanotus*). *Animal reproduction science*, **109**(1-4), 330-342.
- 206. Hall, S. J. G. (1991).** Body dimensions of Nigerian cattle, sheep and goats. *Anim. Prod.*, **53**(1), 61-9.
- 207. Hall, S. J., & Ruane, J. (1993).** Livestock breeds and their conservation: a global overview. *Conservation biology*, **7**(4), 815-825.
- 208. Hämäläinen, M., Nieminen, R., Vuorela, P., Heinonen, M., & Moilanen, E. (2007).** Anti-inflammatory effects of flavonoids: genistein, kaempferol, quercetin, and daidzein inhibit STAT-1 and NF- κ B activations, whereas flavone, isorhamnetin, naringenin, and pelargonidin inhibit only NF- κ B activation along with their inhibitory effect on iNOS expression and NO production in activated macrophages. *Mediators of inflammation*, **2007**.
Nj.
- 209. Hanzen, C. (2010).** L'insémination artificielle chez les ruminants. *En ligne*, 1-15.
- 210. Haslam, E. (1989).** Chemistry and pharmacology of natural products. *Plant Polyphenols Vegetable Tannins*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- 211. Havsteen, B. (1983).** Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. *Biochemical pharmacology*, **32**(7), 1141-1148.
- 212. Hébert, A. (2011).** Caractérisation de l'activité phosphodiesterase chez les spermatozoïdes bovins. *Département des Sciences Animales, faculté des sciences de l'agriculture et de l'alimentation université laval québec* : 162.
- 213. Heise, A., Thompson, P. N., & Gerber, D. (2011).** Influence of seminal plasma on fresh and post-thaw parameters of stallion epididymal spermatozoa. *Animal reproduction science*, **123**(3-4), 192-201.

- 214. Henri, W., Zuidberg, K & Hiemstra, S.J. (2011).** Methods (poultry semen, ram epididymal semen, stallion semen, *Centre for Genetic Resources, The Netherlands (CGN) Animal Sciences Group of Wageningen UR- Lelystad, The Netherlands.*
- 215. Herrera, J. A., Quintana, J. A., Lopez, M. A., Betancourt, M., & Fierro, R. (2005).** Individual cryopreservation with dimethyl sulfoxide and polyvinylpyrrolidone of ejaculates and pooled semen of three avian species. *Archives of andrology*, **51**(5), 353-360.
- 216. Herrick, S. B., Schweissinger, D. L., Kim, S. W., Bayan, K. R., Mann, S., & Cardullo, R. A. (2005).** The acrosomal vesicle of mouse sperm is a calcium store. *Journal of cellular physiology*, **202**(3), 663-671.
- 217. Hess, R. A., Thurston, R. J., & Biellier, H. V. (1976).** Morphology of the epididymal region and ductus deferens of the turkey (*Meleagris gallopavo*). *Journal of anatomy*, **122**(Pt 2), 241-252.
- 218. Hicks K D (1992).** Ratite reproduction. Proceedings of the Annual Conference of the Association of Avian Veterinarians, 318-325.
- 219. Hinton, B. T., Palladino, M. A., Rudolph, D., & Labus, J. C. (1995).** The epididymis as protector of maturing spermatozoa. *Reproduction, Fertility and Development*, **7**(4), 731-745.
- 220. Hirano, Y., Shibahara, H., Obara, H., Suzuki, T., Takamizawa, S., Yamaguchi, C., ... & Sato, I. (2001).** Andrology: Relationships between sperm motility characteristics assessed by the computer-aided sperm analysis (CASA) and fertilization rates in vitro. *Journal of assisted reproduction and genetics*, **18**(4), 215-220.
- 221. Hori, T., Atago, T., Kobayashi, M., & Kawakami, E. (2015).** Influence of different methods of collection from the canine epididymides on post-thaw caudal epididymal sperm quality. *Journal of Veterinary Medical Science*, **77**(5), 625-630.
- 222. Hossain, A. M., Rizk, B., Barik, S., Huff, C., & Thorneycroft, I. H. (1998).** Time course of hypo-osmotic swellings of human spermatozoa: evidence of ordered transition between swelling subtypes. *Human reproduction (Oxford, England)*, **13**(6), 1578-1583.
- 223. Howarth BJ,r. (1983).** Fertilizing ability of cock spermatozoa from the testis epididymis and vas deferens following intramagnal insemination. *Biological Reproduction*, **28**:586-590
- 224. Howarth Jr, B. (1983).** Fertilizing Ability of Cock Spermatozoa from the Testis Epididymis and Vas Deferens Following Intramagnal Insemination. *Biology of Reproduction*, **28**(3), 586-590.
- 225. Hunnicutt, G. R., Primakoff, P., & Myles, D. G. (1996).** Sperm surface protein PH-20 is bifunctional: one activity is a hyaluronidase and a second, distinct activity is required in secondary sperm-zona binding. *Biology of reproduction*, **55**(1), 80-86.
- 226. Ilio, K. Y., & Hess, R. A. (1994).** Structure and function of the ductuli efferentes: a review. *Microscopy research and technique*, **29**(6), 432-467.

227. **Ingrid, D. (2008).** *Analyse génétique et modélisation de la production de semence et de la réussite de l'insémination artificielle en ovin* (Doctoral dissertation, Thèse Pour obtenir le grade de Docteur d'AgroParisTech Discipline: Génétique animale).
228. **Issa, M., Yenikoye, A., Marichatou, H., & Banoin, M. (2001).** Spermogramme de béliers Peuls bicolores et Touaregs: influence du type génétique et de la saison. *Revue d'élevage et de médecine vétérinaire des pays tropicaux*, *54*(3-4), 269-275.
229. **James, E. R., Carrell, D. T., Aston, K. I., Jenkins, T. G., Yeste, M., & Salas-Huetos, A. (2020).** The Role of the Epididymis and the Contribution of Epididymosomes to Mammalian Reproduction. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(15), 5377.
230. **Janssen, S. J., Kirby, J. D., Hess, R. A., Rhoads, M., Bunick, D., Bailey, K. L., ... & Bahr, J. M. (2000).** Identification of epididymal stones in diverse rooster populations. *Poultry science*, *79*(4), 568-574.
231. **Javid, A., Ashraf, M., Mahmud, A., Altaf, M., Hussain, S. M., Shahbaz, M., & Iqbal, K. J. (2018).** Studies on Semen Morphology and Effects of Artificial Insemination on Hatchability in Turkeys (*Meleagris gallopavo*). *Pakistan Journal of Zoology*, *50*(2), 1-4.
232. **Johnston, S. D., Lever, J., McLeod, R., Qualischefski, E., Brabazon, S., Walton, S., & Collins, S. N. (2014).** Extension, osmotic tolerance and cryopreservation of saltwater crocodile (*Crocodylus porosus*) spermatozoa. *Aquaculture*, *426*, 213-221.
233. **Jones R. C. (1998).** Evolution of the vertebrate epididymis. *Journal of reproduction and fertility. Supplement*, *53*, 163-181..
234. **Jones RC and Lin M (1993).** Spermatogenesis in birds. *Oxford Reviews of Reproductive Biology*.*15*: 233-264.
235. **Jones RC, Clulow J, Kidd G, Chaturapanich G, Nixon B, Dacheux JL (2003).** The avian epididymis: a simple conduit or a sophisticated adaptation. In *The Third International Conference on the Epididymis*, 138-148.
236. **Jones, B. A., Grace, D., Kock, R., Alonso, S., Rushton, J., Said, M. Y., ... & Pfeiffer, D. U. (2013).** Zoonosis emergence linked to agricultural intensification and environmental change. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *110*(21), 8399-8404.
237. **Jones, R. C., Dacheux, J. L., Nixon, B., & Ecroyd, H. W. (2007).** Role of the epididymis in sperm competition. *Asian journal of andrology*, *9*(4), 493-499.
238. **Kaabi, M., Paz, P., Alvarez, M., Anel, E., Boixo, J. C., Rouissi, H., ... & Anel, L. (2003).** Effect of epididymis handling conditions on the quality of ram spermatozoa recovered post-mortem. *Theriogenology*, *60*(7), 1249-1259.
239. **Kadirvel, G., Kumar, S., & Kumaresan, A. (2009).** Lipid peroxidation, mitochondrial membrane potential and DNA integrity of spermatozoa in relation to intracellular reactive oxygen species in liquid and frozen-thawed buffalo semen. *Animal reproduction science*, *114*(1-3), 125-134.
240. **Kadirvel, G., Kumar, S., & Kumaresan, A. (2009).** Lipid peroxidation, mitochondrial membrane potential and DNA integrity of spermatozoa in relation to intracellular reactive

- oxygen species in liquid and frozen-thawed buffalo semen. *Animal reproduction science*, *114*(1-3), 125-134.
- 241. Kaldas, M. I., Walle, U. K., Van Der Woude, H., McMillan, J. M., & Walle, T. (2005).** Covalent binding of the flavonoid quercetin to human serum albumin. *Journal of agricultural and food chemistry*, *53*(10), 4194-4197.
- 242. Kao, S. H., Chao, H. T., Chen, H. W., Hwang, T. I., Liao, T. L., & Wei, Y. H. (2008).** Increase of oxidative stress in human sperm with lower motility. *Fertility and sterility*, *89*(5), 1183-1190.
- 243. Karja, N. W. K., Respaty, E. M. A., Nuraini, I., Prihatno, S. A., & Gustari, S. (2010).** Characteristic of frozen-thawed epididymal spermatozoa and refrigerated storage of ram spermatozoa. *Journal of the Indonesian Tropical Animal Agriculture*, *35*(1), 63-67.
- 244. Kasimanickam, R., Kasimanickam, V., Thatcher, C. D., Nebel, R. L., & Cassell, B. G. (2007).** Relationships among lipid peroxidation, glutathione peroxidase, superoxide dismutase, sperm parameters, and competitive index in dairy bulls. *Theriogenology*, *67*(5), 1004-1012.
- 245. Kathiravan, P., Kalatharan, J., Edwin, M. J., & Veerapandian, C. (2008).** Computer automated motion analysis of crossbred bull spermatozoa and its relationship with in vitro fertility in zona-free hamster oocytes. *Animal reproduction science*, *104*(1), 9-17.
- 246. Katz, D.F., Drobnis, E.Z., Cherr, G.N., Baltz, J., Yudin, A.I., Cone, R.A., & Cheng, L.Y. (1987).** The biophysics of sperm penetration of the cumulus and zona pellucida. *In The New Horizons in Sperm Research* pp 275-285.
- 247. Khaki, A., Fathiazad, F., Nouri, M., Khaki, A., Maleki, N. A., Khamnei, H. J., & Ahmadi, P. (2010).** Beneficial effects of quercetin on sperm parameters in streptozotocin-induced diabetic male rats. *Phytotherapy Research*, *24*(9), 1285-1291.
- 248. Khanduja, K. L., Verma, A., & Bhardwaj, A. (2001).** Impairment of human sperm motility and viability by quercetin is independent of lipid peroxidation. *Andrologia*, *33*(5), 277-281.
- 249. Khassal Mohammed. (2009).** *Les causes genetiques de l'infertilité chez l'homme*. thèse présentée à l'université Mohammed V- faculté de médecine et de pharmacie - RABAT - THESE N° : 232, p37.
- 250. Kikuchi, K., Nagai, T., Kashiwazaki, N., Ikeda, H., Noguchi, J., Shimada, A., ... & Kaneko, H. (1998).** Cryopreservation and ensuing in vitro fertilization ability of boar spermatozoa from epididymides stored at 4 C. *Theriogenology*, *50*(4), 615-623.
- 251. Kilian, I., Lubbe, K., Bartels, P., Friedmann, Y., & Denniston, R. S. (2000).** Evaluating epididymal sperm of African wild ruminants: longevity when stored at 4 C and viability following cryopreservation. *Theriogenology*, *53*(1), 330-336.
- 252. Kim, T. H., Yuh, I. S., Park, I. C., Cheong, H. T., Kim, J. T., Park, C. K., & Yang, B. K. (2014).** Effects of Quercetin and Genistein on Boar Sperm Characteristics and Porcine IVF Embryo Developments. *Journal of Embryo Transfer*, *29*(2), 141-148.

253. King, A. M. Y., & Young, G. (1999). Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. *Journal of the American dietetic association*, **99**(2), 213-218.
254. Kishikawa, H., Tateno, H., & Yanagimachi, R. (1999). Fertility of mouse spermatozoa retrieved from cadavers and maintained at 4 C. *Reproduction*, **116**(2), 217-222.
255. Knobil, E. (1981). Patterns of hypophysiotropic signals and gonadotropin secretion in the rhesus monkey. *Biology of reproduction*, **24**(1), 44-49.
256. Konfe, H. (2014). Etude spermologique des bovins de races locales de l'Afrique de l'Ouest: cas du Borgou, du taurin Lagunaire, du taurin N'Dama et du Zébu Peulh. *Université Polytechnique de Bobo-Dioulasso, Institut du Développement Rural, Mémoire de Master en Production et Industrie Animales*, pp 69.
257. Kumar E and Holt WV (2014). Impacts of endocrine disrupting chemicals on reproduction in wildlife. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, **753**: 55–70.
258. Kumar, D., Kumar, P. R. A. D. E. E. P., Singh, P. A. W. A. N., Yadav, S. P., Sarkar, S. K., Bharadwaj, A., & Yadav, P. S. (2014). Characteristics of frozen thawed semen in predicting the fertility of buffalo bulls. *Indian J Anim Sci*, **84**, 389-392.
259. Kumar, D., Kumar, P. R. A. D. E. E. P., Singh, P. A. W. A. N., Yadav, S. P., Sarkar, S. K., Bharadwaj, A., & Yadav, P. S. (2014). Characteristics of frozen thawed semen in predicting the fertility of buffalo bulls. *Indian J Anim Sci*, **84**, 389-392.
260. Kuppusamy, U. R., Khoo, H. E., & Das, N. P. (1990). Structure-activity studies of flavonoids as inhibitors of hyaluronidase. *Biochemical pharmacology*, **40**(2), 397-401.
261. Kuzlu, M. and Taskin A (2017). The effect of different extenders on the sperm motility and viability of frozen Turkey semen. *Indian Journal Animal Research*, **51** (2): 235-241.
262. Kwon, S., Hess, R. A., Bunick, D., Nitta, H., Janulis, L., Osawa, Y., & Bahr, J. M. (1995). Rooster testicular germ cells and epididymal sperm contain P450 aromatase. *Biology of reproduction*, **53**(6), 1259-1264.
263. Labbé, C., Blesbois E., Lebouf, B., Martoriati, A., Guillouet, P., Stradaioli, G., & Magistrini, M.(2003).Techniques de laconervation du sperme chez plusieurs vertébrés domestique :protecton des lipideesmembranaires ,intégrité du noyou et élargissement des methodes .143-157.
264. Lamraoui, R., Bouzebda-Afri, F., & Bouzebda, Z. (2016). Biochemical Blood Parameters and Body Weight Change during Postpartum Period of Ouled Djellal Ewes in Algerian Semi-Arid Area. *Global Veterinaria*, **17**(6).
265. Laurence Drèze. (2018). Élevage intensif et bien-être animal. Toutes les publications. Sciences et technologies, Analyses (<https://etopia.be/elevage-intensif-et-bien-etre-animal/>). consulté le 14/01/2021
266. Lefebvre, J. (2009). Les gènes et protéines BSP chez la souris et l'humain: clonage, caractérisation, expression sous forme recombinante et étude des fonctions biologiques. Thèse présentée à la Faculté des études supérieures en vue de l'obtention du grade de

Philosophiae Doctor (Ph-D) en Biochimie, département de biochimie, faculté de Médecine, Université de Montréal. p (235,4-7).

267. Lemoine, M., Mignon-Grasteau, S., Grasseau, I., Magistrini, M., & Blesbois, E. (2011). Ability of chicken spermatozoa to undergo acrosome reaction after liquid storage or cryopreservation. *Theriogenology*, *75*(1), 122–130. doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.07.017.
268. Leon-Quinto, T., Simon, M. A., Cadenas, R., Jones, J., Martinez-Hernandez, F. J., Moreno, J. M., ... & Soria, B. (2009). Developing biological resource banks as a supporting tool for wildlife reproduction and conservation: the Iberian lynx bank as a model for other endangered species. *Animal reproduction science*, *112*(3-4), 347-361.
269. Leroy, G., & Verrier, É. (2021). Contribution des ressources génétiques animales aux services écosystémiques liés au développement territorial. *Essais. Revue interdisciplinaire d'Humanités, (Hors-série 6)*, 79-87.
270. Leroy, G., Boettcher, P., Besbes, B., Danchin-Burge, C., Baumung, R., & Hiemstra, S. J. (2019). Cryoconservation of animal genetic resources in Europe and two African countries: A gap analysis. *Diversity*, *11*(12), 240.
271. Li, M. W., Yudin, A. I., VandeVoort, C. A., Sabeur, K., Primakoff, P., & Overstreet, J. W. (1997). Inhibition of monkey sperm hyaluronidase activity and heterologous cumulus penetration by flavonoids. *Biology of reproduction*, *56*(6), 1383-1389.
272. Lima, I. C. S., Andrade, I. R. A., Aguiar, G. V., Silva, M. M., Catunda, A. G. V., Martins, G. A., ... & Campos, A. C. N. (2013). In vitro evaluation of goat cauda epididymal sperm, cooled in different extenders at 4°C. *Archivos de zootechnia*, *62*(239), 429-437.
273. Lino, B. F. (2011). The output of spermatozoa in rams. Relationship to scrotal circumference, testis weight, and the number of spermatozoa in different parts of the urogenital tract. *Animal Science Papers and Reports. Institute of Genetics and Animal Breeding, Jastrzębiec, Poland*, *29* (1), 75-84.
274. Lodovici, M., Guglielmi, F., Casalini, C., Meoni, M., Cheynier, V., & Dolara, P. (2001). Antioxidant and radical scavenging properties in vitro of polyphenolic extracts from red wine. *European Journal of Nutrition*, *40*(2), 74-77.
275. Lone, F. A., Islam, R., Khan, M. Z., & Sofi, K. A. (2011). Effect of transportation temperature on the quality of cauda epididymal spermatozoa of ram. *Animal reproduction science*, *123*(1-2), 54-59.
276. Long, J.A. (2014). Applied andrology in chickens and turkeys. In *Animal Andrology. Theories and Applications*. Chenoweth, P.J., Lorton, S.P., Eds.; CABI: Boston, MA, USA. pp. 197–225.
277. Łukaszewicz, E., Jerysz, A., Partyka, A., & Siudzińska, A. (2008). Efficacy of evaluation of rooster sperm morphology using different staining methods. *Research in Veterinary Science*, *85*(3), 583-588.

- 278. Lusignan, M. F. (2011).** *Étude du mécanisme de protection des spermatozoïdes de mammifères par le lait.* Thèse présentée à la faculté de médecine en vue de l'obtention du grade de Philosophiae Doctor (Ph-D). En Biochimie Université de Montréal ; Département de Biochimie. Faculté de médecine, p (4,21).
- 279. Malik, A., Azam, S., Hadi, N., & Hadi, S. M. (2003).** DNA degradation by water extract of green tea in the presence of copper ions: implications for anticancer properties. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, **17**(4), 358-363.
- 280. Malo, A. F., Roldan, E. R., Garde, J., Soler, A. J., & Gomendio, M. (2005).** Antlers honestly advertise sperm production and quality. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, **272**(1559), 149-157.
- 281. Malpaux, B.(2006).** Seasonal regulation of reproduction in mammals. Knobil & Neill's *Knobil & Neill's physiology of reproduction*, 3ème édition, Elsevier, 2006, 0-12-515401-1. ([hal-02811741](#)).
- 282. Malvika, S., Ghosh, P. R., Dhar, B., Devi, N. N., Paul, R., Halder, A., ... & Ghosh, S. K. (2019).** Genetic status of indigenous poultry (red jungle fowl) from India. *Gene*, **705**, 77-81.
- 283. MamNoury, A.S. (2013).** *Caractéristiques spermatiques du bouc du sahel au Niger*, la Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odonto- Stomatologie de Dakar pour obtenir le grade de docteur en médecine vétérinaire (diplome d'état) pp106.
- 284. Mamuad, F. V., Venturina, E. V., & Saito, H. (2004).** Collection, processing and handling buffalo semen. *Water Buffaloes and Beef Cattle Improvement project (WBBCIP)*.
- 285. Mandal, R., Badyakar, D., & Chakrabarty, J. (2014).** Role of membrane lipid fatty acids in sperm cryopreservation. *Advances in Andrology*, **2014**.
- 286. Mandiki, S. N. M., Derycke, G., Bister, J. L., & Paquay, R. (1998).** Influence of season and age on sexual maturation parameters of Texel, Suffolk and Ile-de-France rams: 1. Testicular size, semen quality and reproductive capacity. *Small ruminant research*, **28**(1), 67-79.
- 287. Mansbridge, R. J. (2004).** Conservation of farm animal genetic resources-a UK national view. *BSAP Occasional Publication*, **30**, 37-43.
- 288. Marc, S. (2015).** *Actualités en cryoconservation des semences des principales espèces d'intérêt vétérinaire.* Et soutenue publiquement le 27 Novembre 2015 pour obtenir le grade de Docteur Vétérinaire. p(46-78-98).
- 289. Marcus-Braun, N., Braun, G., Potashnik, G., & Har-Vardi, I. (2004).** Effect of cryopreservation on quality and fertilization capacity of human sperm. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, **116**(1), 63-66.
- 290. Margot, S., Clémence, F. (2018).** Cryobanque des équidésLa cryobanque permet de conserver de la semence congelée. L'objectif de lacollection nationale est de conserver un échantillon représentatif de ladiversité génétique des principales espèces d'élevage.

<https://equipedia.ifce.fr/elevage-et-entretien/elevage/variabilite-genetique/cryobanque-des-equides>.

- 291. Marie, A. (2010).** *Actualités sur les méthodes d'évaluation de la qualité de la semence de l'étalon*. these de Docteur Vétérinaire, université Claude-Bernard - Lyon I (Médecine - Pharmacie). Thèse n°18.
- 292. Martínez-Fresneda, L., Castaño, C., Bóveda, P., Tesfaye, D., Schellander, K., Santiago-Moreno, J., & García-Vázquez, F. A. (2019).** Epididymal and ejaculated sperm differ on their response to the cryopreservation and capacitation processes in mouflon (*Ovis musimon*). *Scientific reports*, **9**(1), 1-13.
- 293. Martinez-Pastor, F., Garcia-Macias, V., Alvarez, M., Chamorro, C., Herraez, P., de Paz, P., & Anel, L. (2006).** Comparison of two methods for obtaining spermatozoa from the cauda epididymis of Iberian red deer. *Theriogenology*, **65**(3), 471-485.
- 294. Martínez-Pastor, F., Guerra, C., Kaabi, M., Diaz, A. R., Anel, E., Herraez, P., ... & Anel, L. (2005).** Decay of sperm obtained from epididymes of wild ruminants depending on postmortem time. *Theriogenology*, **63**(1), 24-40.
- 295. Martini, M., Salari, F., Altomonte, I., Rignanese, D., Chessa, S., Gigliotti, C., & Caroli, A. (2010).** The Garfagnina goat: a zootechnical overview of a local dairy population. *Journal of dairy science*, **93**(10), 4659-4667.
- 296. Martins, C. F., Driessen, K., Costa, P. M., Carvalho-Neto, J. O., De Sousa, R. V., Rumpf, R., & Dode, M. N. (2009).** Recovery, cryopreservation and fertilization potential of bovine spermatozoa obtained from epididymides stored at 5 C by different periods of time. *Animal reproduction science*, **116** (1-2), 50-57.
- 297. Martins, C. F., Rumpf, R., Pereira, D. C., & Dode, M. N. (2007).** Cryopreservation of epididymal bovine spermatozoa from dead animals and its uses in vitro embryo production. *Animal reproduction science*, **101**(3-4), 326-331.
- 298. Mata-Campuzano, M., Álvarez-Rodríguez, M., Tamayo-Canul, J., López-Urueña, E., de Paz, P., Anel, L., ... & Álvarez, M. (2014).** Refrigerated storage of ram sperm in presence of Trolox and GSH antioxidants: Effect of temperature, extender and storage time. *Animal reproduction science*, **151**(3-4), 137-147.
- 299. Mavi G.K., Dubey P.P., Cheema R.S., (2017).** Comparison of Sperm Attributes in two Indigenous Layer Breeds and their Relationship with Fertility. *Theriogenology Insign*, **7**(2): 123-129.
- 300. Mavi, G. K., Dubey, P. P., Cheema, R. S., Dash, S. K., & Bansal, B. K. (2019).** Comparative analysis of semen quality parameters and their relationship with fertility in different genetic groups of layer chicken. *Indian Journal of Animal Research*, **53**(10), 1269-1274.
- 301. McNiven, M. A., & Richardson, G. F. (2006).** Effect of quercetin on capacitation status and lipid peroxidation of stallion spermatozoa. *Cell Preservation Technology*, **4**(3), 169-177.
- 302. Medeiros, C. M. O., Forell, F., Oliveira, A. T. D., & Rodrigues, J. L. (2002).** Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better?. *Theriogenology*, **57**(1), 327-344.

- 303. Mediouni, K. (2000).** Stratégie Algérienne de conservation et d'utilisation durable de la diversité biologique. *Ministère de l'Environnement-PNUD, Alger.*
- 304. Mehouchi, M. (1995).** Caractéristiques de reproduction chez les béliers de race Barbarine et Noire de Thibar. *Cahiers Options Méditerranéennes*, **6**, 35-41.
- 305. Meizel, S. (1984).** The importance of hydrolytic enzymes to an exocytotic event, the mammalian sperm acrosome reaction. *Biological Reviews*, **59**(1), 125-157.
- 306. Menzies, P. (2011).** Reproduction, section 8, Quelle est la saison naturelle de reproduction des brebis, p 90.
- 307. Meyers, S. A., Yudin, A. I., Cherr, G. N., VandeVoort, C. A., Myles, D. G., Primakoff, P., & Overstreet, J. W. (1997).** Hyaluronidase activity of macaque sperm assessed by an in vitro cumulus penetration assay. *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research*, **46**(3), 392-400.
- 308. Michel, S. (2009).** *Les bantengs (Bos Javanicus), biologie, situation actuelle et conservation.* Thèse pour le doctorat vétérinaire présentée et soutenue publiquement devant la faculté de médecine de Créteil- module intégré, université de Montpellier, faculté de médecine Montpellier – Nimes Ecole nationale vétérinaire d'Alfort., p (73-77).
- 309. Minaei, M. B., Barbarestani, M., Nekoonam, S., Abdolvahabi, M. A., Takzare, N., Asadi, M. H., ... & Amidi, F. (2012).** Effect of Trolox addition to cryopreservation media on human sperm motility. *Iranian journal of reproductive medicine*, **10**(2), 99.
- 310. Mizushima, S., Hiyama, G., Shiba, K., Inaba, K., Dohra, H., Ono, T., ... & Sasanami, T. (2014).** The birth of quail chicks after intracytoplasmic sperm injection. *Development*, **141**(19), 3799-3806.
- 311. Mohammadzadeh, S., Maksudov, G. Y., & Doronin, Y. K. (2011).** Survival of spermatozoa in the genital tract of mice post mortem. In *Doklady Biological Sciences* (Vol. 436, No. 1, p. 62).
- 312. Mondal, M., Karunakaran, M., Lee, K. B., & Rajkhowa, C. (2010).** Characterization of Mithun (*Bos frontalis*) ejaculates and fertility of cryopreserved sperm. *Animal reproduction science*, **118**(2-4), 210-216.
- 313. Monteiro, G. A., Papa, F. O., Zahn, F. S., Dellaqua Jr, J. A., Melo, C. M., Maziero, R. R. D., ... & Guasti, P. N. (2011).** Cryopreservation and fertility of ejaculated and epididymal stallion sperm. *Animal reproduction science*, **127**(3-4), 197-201.
- 314. Moreno, J. S., & Lucero, D. A. G. (2019).** Criopreservación de espermatozoides en especies domésticas y silvestres: estado actual de los avances tecnológicos. *Revista Ecuatoriana de Ciencia Animal*, **3**(2), 18-38.
- 315. Morris, L., Tiplady, C., & Allen, W. R. (2002).** The in vivo fertility of cauda epididymal spermatozoa in the horse. *Theriogenology*, **58**(2-4), 643-646.
- 316. Moula, N. (2012).** *Biodiversité avicole dans les pays industrialisés et en développement: caractérisation et étude des performances de production de races gallines locales* (Doctoral dissertation, Université de Liège, Liège, Belgique).

317. **Moula, N., Antoine-Moussiaux, N., Farnir, F., Detilleux, J., & Leroy, P. (2009).** Réhabilitation socio-économique d'une poule locale en voie d'extinction: la poule Kabyle (Thayazit lekvayel). In *Annales de Médecine vétérinaire*, **153**, 178-186. Université de Liège.
318. **Moura, A. A., Souza, C. E., Stanley, B. A., Chapman, D. A., & Killian, G. J. (2010).** Proteomics of cauda epididymal fluid from mature Holstein bulls. *Journal of proteomics*, **73**(10), 2006-2020.
319. **Mphaphathi ML, Seshoka MM, Luseba, D, Sutherland B, Nedambale TL.(2016).** The characterisation and cryopreservation of Venda chicken semen. *Asian Pacific Journal of Reproduction*, **5**(2): 132–139.
320. **Munro, S. S. (1935).** Motility and fertilizing capacities of fowl sperm in the excretory ducts. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, **33**(2), 255-257.
321. **Munro, S. S. (1938).** Functional changes in fowl sperm during their passage through the excurrent ducts of the male. *Journal of Experimental Zoology*, **79**(1), 71-92.
322. **Najafi, A., Kia, H. D., Mohammadi, H., Najafi, M. H., Zanganeh, Z., Sharafi, M., ... & Adeldust, H. (2014).** Different concentrations of cysteamine and ergothioneine improve microscopic and oxidative parameters in ram semen frozen with a soybean lecithin extender. *Cryobiology*, **69**(1), 68-73.
323. **Nalley, W. M. M., & Arifiantini, R. I. (2013).** The hypo-osmotic swelling test in fresh garut ram spermatozoa. *Journal of the Indonesian Tropical Animal Agriculture*, **38**(4), 212-216.
324. **Nasir, M., Njidda, A. A., & Hassan, A. M. (2014).** Testicular histometry, gonadal and extra gonadal sperm reserve of red Sokoto bucks fed cotton seed cake. *J. Sci*, **4**(4), 227-232.
325. **Ngou Ngoupayou, J. D. (1990).** Country report on smallholder rural poultry production in Cameroon. In *CTA seminar proceedings*, **2**, 39-47.
326. **Nicaise, C. (2015).** Système génital male. *SVETB303*, p9.
327. **Nichi, M., Bols, P. E. J., Züge, R. M., Barnabe, V. H., Goovaerts, I. G. F., Barnabe, R. C., & Cortada, C. N. M. (2006).** Seasonal variation in semen quality in *Bos indicus* and *Bos taurus* bulls raised under tropical conditions. *Theriogenology*, **66**(4), 822-828.
328. **Nichi, M., Goovaerts, I. G. F., Cortada, C. N. M., Barnabe, V. H., De Clercq, J. B. P., & Bols, P. E. J. (2007).** Roles of lipid peroxidation and cytoplasmic droplets on in vitro fertilization capacity of sperm collected from bovine epididymides stored at 4 and 34 C. *Theriogenology*, **67**(2), 334-340.
329. **Nijs, M., Creemers, E., Cox, A., Janssen, M., Vanheusden, E., Castro-Sanchez, Y., ... & Ombelet, W. (2009).** Influence of freeze-thawing on hyaluronic acid binding of human spermatozoa. *Reproductive biomedicine online*, **19**(2), 202-206.
330. **Nitiema, L. W., Savadogo, A., Simporé, J., Dianou, D., & Traore, A. S. (2012).** In vitro antimicrobial activity of some phenolic compounds (coumarin and quercetin) against gastroenteritis bacterial strains. *Int J Microbiol Res*, **3**(3), 183-187.

331. Nixon, B., Ewen, K. A., Krivanek, K. M., Clulow, J., Kidd, G., Ecroyd, H., & Jones, R. C. (2014). Post-testicular sperm maturation and identification of an epididymal protein in the Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). *Reproduction*, 147(3), 265-277.
332. Noblanc, A., Kocer, A., & Drevet, J. R. (2012). Protection post-testiculaire des gamètes mâles contre les dommages radicalaires-Le rôle de l'épididyme. *médecine/sciences*, 28(5), 519-525.
333. Noirault, J., Brillard, J.P., Bakst, M.R. (2006). Spermatogenesis in the turkey (*Meleagris gallopavo*): quantitative approach in immature and adult males subjected to various photoperiods. *Theriogenology* 65, 845–859.
334. O'Brien, J. K., Hollinshead, F. K., Evans, K. M., Evans, G., & Maxwell, W. M. C. (2004). Flow cytometric sorting of frozen–thawed spermatozoa in sheep and non-human primates. *Reproduction, Fertility and development*, 15(7), 367-375.
335. Obidi, J. A., Onyeanusi, B. I., Rekwot, P. I., Ayo, J. O., & Dzenda, T. (2008). Seasonal variations in seminal characteristics of Shikabrown breeder cocks. *International Journal of Poultry Science*, 7(12), 1219-1223.
336. Okamura, F. , Nishiyama,H. (1978). The passage of spermatozoa through the vitelline membrane in the domestic fowl. *Gallus gallus. Cell Tissue Res*, 188:497–508.
337. Oldenbroek, J. K. (1999). *Genebanks and the management of farm animal genetic resources*. ID-DLO.
338. Oliveira, C. H. D., Vasconcelos, A. B. D., Souza, F. A., Martins-Filho, O. A., Silva, M. X., Varago, F. C., & Lagares, M. D. A. (2010). Cholesterol addition protects membrane intactness during cryopreservation of stallion sperm. *Animal reproduction science*, 118(2-4), 194-200.
339. Oliveira, I. R. S. D., Alves, H. M., Castelo, T. S., Bezerra, F. S. B., Bezerra, A. C. D. S., & Silva, A. R. (2013). Correlations between hypoosmotic swelling test and the classical evaluation of goat semen. *Ciência Animal Brasileira*, 14(2), 216-221.
340. Olugbenga, O. M., Oniovosa, U., Oyeyemi, M., & Ubiogoro, O. (2005). Spermogram and morphological characteristics in testicular and epididymal spermatozoa of Large White Boar in Nigeria. *Int. J. morphol*, 23(3), 235-239.
341. Ondho, Y. S. (2014). Comparative studies of semen quality on different breed of chicken in poultry breeding center Temanggung-central Java. *Int. Ref. J. Eng. Sci*, 3, 94-103.
342. Orgebin-Crist, M. C., Boivineau, L., & De Fontaubert, Y. (1962). Recherches experimentales sur la duree de passage des spermatozoides dans l'epididyme du taureau. In *Annales de Biologie Animale Biochimie Biophysique*, 2(1), 51-108
343. Ortavant, R. (1959). Déroulement et durée du cycle spermatogénétique chez le bélier. Première partie. In *Annales de zootechnie*, 8(3), 183-244.
344. Ouennes H., Bouzebda-Afri F., Bouzebda Z., & Derouiche L. (2018). La répartition d'une espèce protégée : la Hyène Rayée Hyena hyena dans le Nord-Est Algérien (wilaya

d'El Tarf). Le 3ème workshop international sur la biodiversité et la gestion des écosystèmes exploités Le 27 octobre 2017.

- 345. Ouennes H., Bouzebda-Afri F., Bouzebda Z., Derouiche L., & Choual KH. (2016).** Utilisation du sperme épидидymaire dans la conservation génétique des espèces animales. 1er colloque international d'écophysiologie animale et biodiversité, Alger, Algérie, du 22 au 23 Novembre 2016.
- 346. Ouennes H., Bouzebda-Afri F., & Bouzebda Z. (2013).** Contrôle et intérêt du sperme épидидymaire chez le bélier. 24ème forum international des sciences biologiques et de biotechnologie de l'ATSB, 25-28 Mars .2013, Sousse, Tunisie.
- 347. Ouennes H., Bouzebda-Afri F., & Bouzebda Z. (2014).** Identification et caractéristiques du sperme épидидymaire chez le bélier .12èmes Journées Internationales des Sciences Vétérinaires (JISV) portant sur « La filière des petits ruminants en Algérie : une richesse à promouvoir», Alger .
- 348. Ouennes H., Bouzebda-Afri F., & Bouzebda Z. (2015).** Utilisation du sperme épидидymaire dans la conservation génétique des espèces animales. 1er colloque international de la biologie appliquée (CIBA 2015), Oran.
- 349. Ouennes H., Bouzebda-Afri F., & Bouzebda Z. (2015).** Utilisation du sperme épидидymaire dans la conservation génétique des espèces animales. International workshop on Management and Genetic Improvement of Animal Resources «MGIAR1», Tlemcen.
- 350. Ouennes H., Bouzebda-Afri F., & Bouzebda Z. (2016).** Condition et caractéristiques de la conservation post- mortem du sperme epидидymaire du bélier. 84ème congrès de l'Acfas qui s'est tenu à l'Université du Québec à Montréal, du 9 au 13 mai 2016.
- 351. Ouennes H., Bouzebda-Afri F., & Bouzebda Z. (2016).** Utilisation du sperme épидидymaire dans la conservation génétique des espèces animales. 1er séminaire national. Environnement, risque et santé, Souk Ahras, Algérie, 05 et 06 Décembre 2016.
- 352. Ouennes H., Bouzebda-Afri F., Bouzebda Z., Choual K., Benlakehal A., Boucekhchokh M., & Aoudi A. (2013).** La varroas généralité et diagnostic de laboratoire.1ère Journée sur l'apiculture perspectives et développement, 12 Janv.2013, Souk Ahras, Algérie.
- 353. Ouennes H., Bouzebda-Afri F., Bouzebda Z., Choual K, Bentradi S & Aoudi A. (2013).** Analyse de la filière apicole dans la région d'El-Tarf .1ère Journée sur l'apiculture perspectives et développement, 12 Janv.2013. Souk Ahras, Algérie.
- 354. Ouennes H., Michentel M., Bouzebda-Afri F., Bouzebda Z., Choual KH., Derouiche L., & Rebiai S. (2016).** La répartition d'une espèce protégée : la Hyène Rayée *Hyena hyena* dans le Nord-Est Algérien (wilaya d'El Tarf).1er colloque international d'écophysiologie animale et biodiversité, Alger, Algérie, du 22 au 23 Novembre 2016.
- 355. Ouennes H., Michentel M., Bouzebda-Afri F., Bouzebda Z., & Rebiai S. (2016).** La répartition d'une espèce protégée : l'Hyène Rayée *Hyena hyena* dans le Nord-Est Algérien

(wilaya d'El Tarf).1er Séminaire internationale sur la biodiversité et gestion des ressources naturelles (passé, présent et futur), Souk Ahras.

- 356. Ouennes H. (2012).** *contrôle et intérêts du sperme epididymaire*. Thèse présenté pour l'Obtention du Diplôme de Magister. En Médecine Vétérinaire. Spécialité: Sciences Vétérinaires. Option: Zootechnie (2-6).
- 357. Padhi, M. K. (2016).** Importance of indigenous breeds of chicken for rural economy and their improvements for higher production performance. Scientifica, 2016.
- 358. Parera, F., Prihatiny, Z., Souhoka, D. F., & Rizal, M. (2009).** Pemanfaatan sari wortel sebagai pengencer alternatif spermatozoa epididimis sapi Bali. *J. Indon. Trop. Anim. Agric*, **34**(1), 50-56.
- 359. Partyka, A., Bonarska-Kujawa, D., Sporniak, M., Strojecki, M., & Nizański, W. (2016).** Modification of membrane cholesterol and its impact on frozen-thawed chicken sperm characteristics. *Zygote (Cambridge, England)*, **24**(5), 714–723.
- 360. Peixoto, P. C. V. D. A., Coletto, Z. F., Moura, C. S., Almeida, F. C., Soares, P. C., Silva, S. V., & Guerra, M. M. P. (2013).** Effect of Trolox and Glutathione Reduced (Gsh) addition on the In Vitro viability of dog cryopreserved sperm. *Ciência Animal Brasileira*, **14**(4), 436-447.
- 361. Pellestor, F. (2012).** *Génétique - reproduction – développement-histologie des appareils génitaux. module intègre 5 ; PCEM 2*, université de Montpellier- faculté de médecine-Montpellier – Nîmes.
- 362. Peña, F. J., Johannisson, A., Wallgren, M., & Martinez, H. R. (2004).** Antioxidant supplementation of boar spermatozoa from different fractions of the ejaculate improves cryopreservation: changes in sperm membrane lipid architecture. *Zygote*, **12**(2), 117-124
- 363. Perez-Patiño, C., Barranco, I., Li, J., Padilla, L., Martinez, E. A., Rodriguez-Martinez, H., ... & Parrilla, I. (2019).** Cryopreservation differentially alters the proteome of epididymal and ejaculated pig spermatozoa. *International journal of molecular sciences*, **20**(7), 1791.
- 364. Pervage, S., Hassan, M. R., Ershaduzzaman, M., & Khandoker, M. A. M. Y. (2009).** Preservation of liquid semen and Artificial Insemination in native sheep. *Journal of the Bangladesh Agricultural University*, **7** (2), 305-308.
- 365. Pezzanite, L., Bridges, A., & Neary, M. (2010).** Examinations of Rams and Bucks , Breeding Soundness, *Animal Sciences*,2/2010, *Animal Sciences Student, Purdue University, Purdue Extension AS-599-W,World Health Organization 2010* ,
- 366. Piétrement, C. (2006).** *Hétérogénéité physiologique de l'épithélium de l'épididyme: sécrétion de protons via la H⁺-ATPase vacuolaire dans les cellules claires et transport d'eau et de solutés via l'aquaporine 9 dans les cellules principales*. Thèse de doctorat de l'université ; de reims champagne-ardenne sciences de la vie ; Pour obtenir le grade de Docteur de l'Université de Reims Champagne-Ardenne, p (13-18).
- 367. Pimm, S. L., Russell, G. J., Gittleman, J. L., & Brooks, T. M. (1995).** The future of biodiversity. *Science*, **269** (5222), 347-350.

- 368. Pini, T., Leahy, T., Soleilhavoup, C., Tsikis, G., Labas, V., Combes-Soia, L., ... & de Graaf, S. P. (2016).** Proteomic investigation of ram spermatozoa and the proteins conferred by seminal plasma. *Journal of proteome research*, *15*(10), 3700-3711.
- 369. Pizzi, F., Caroli, A., Landini, M., Galluccio, N., Mezzelani, A. and Milanesi, L. (2013).** Conservation of endangered animals: From biotechnologies to digital preservation. *Natural Science*, *5*, 903-913.
- 370. Poivey, J. P., Landais, E., Seitz, J. L., & Kouyate, M. (1981).** Détermination de l'âge des bovins par l'examen de la dentition. Méthodologie et principaux résultats acquis en milieu villageois dans le Nord de la Côte d'Ivoire. *Rev. Elev. Méd. Vét. Pays trop* *34* (1), 55-62.
- 371. Ponthier, J., van den Berghe, F., Parrilla Hernandez, S., Hanzen, C., & Deleuze, S. (2014).** Congélation de sperme dans l'espèce équine: état des lieux et perspectives. In *Annales de Médecine Vétérinaire*, *159* (1), 56-71. Université de Liège.
- 372. Posiere, S. (2002).** *Récolte de la semence de chats (felis catus) par électroéjaculation et par dissection de l'épididyme; comparaison des méthodes, essai de cryoconservation avec un dilueur canin.* Thèse pour le doctorat vétérinaire. faculté de médecine de Creteil, Ecole nationale vétérinaire d'Alfort. p (31-34).
- 373. Prodip, K. S. (2020).** Motility, Viability and Fertilizing Ability of Avian Sperm Stored Under in Vitro Conditions. *Reviews in Agricultural Science*, *8*: 15-27,
- 374. Purdy, P. H. (2006).** A review on goat sperm cryopreservation. *Small Ruminant Research*, *63*(3), 215-225.
- 375. Puybasset, A. (2019).** Formuler l'aliment volaille selon son impact environnemental. Disponible en ligne : <https://www.reussir.fr/volailles/formuler-laliment-selon-son-impact-environnemental>.
- 376. Pym, R. (2013).** Poultry genetics and breeding in developing countries. *Poultry Development Review FAO*, 80-83.
- 377. Rahman, M. B., Vandaele, L., Rijsselaere, T., Zhandi, M., Maes, D., Shamsuddin, M., & Van Soom, A. (2012).** Oocyte quality determines bovine embryo development after fertilisation with hydrogen peroxide-stressed spermatozoa. *Reproduction, Fertility and Development*, *24*(4), 608-618.
- 378. Ramón-Ugalde, J., Tun-Moo, M., Castellanos-Zacarias, C., Loeza-Concha, H., Domínguez-Rebolledo, Á., & Rodríguez-Gutiérrez, I. (2021).** Antioxidant effect of Trolox and Crocin on the cryopreservation of Pelibuey rams semen. *Abanico Veterinario*, *10*(1), 1-9.
- 379. Rasul, Z., Ahmad, N., & Anzar, M. (2001).** Changes in motion characteristics, plasma membrane integrity, and acrosome morphology during cryopreservation of buffalo spermatozoa. *Journal of Andrology*, *22*(2), 278-283.
- 380. Razi, M., Hassanzadeh, S. H., Najafi, G. R., Feyzi, S., Amin, M., Moshtagion, M., & Janbaz, H. (2010).** Histological and anatomical study of the White Rooster of testis, epididymis and ductus deferens. *4*: 229-236.

381. **Rezk, W. A. K. (2009).** *Studies on in vitro fertilization in camels (camelus dromedaries)* , PhD thesis. Faculty of Agriculture, Animal Production Department, Mansoura University), p(14-23).
382. **Rizal, M. (2005).** Daya hidup spermatozoa epididimis domba garut yang dikriopreservasi menggunakan modifikasi pengencer tris. *HAYATI Journal of Biosciences*, *12*(2), 61-66.
383. **Rizal, M. U. H. A. M. M. A. D. (2009).** Daya Hidup Spermatozoa Epididimis Sapi Bali yang Dipreservasi pada Suhu 3–5 o C dalam Pengencer Tris dengan Konsentrasi Laktosa yang Berbeda. *JITV*, *14*(2), 142-149.
384. **Rizal, M., & Boediono, A. (2004).** Viability of rams epididymal sperm after preservation in low temperature (5 deg. C). *Animal Production: Jurnal Produksi Ternak (Indonesia)*.
385. **Rizzi, R., Tullo, E., Cito, A. M., Caroli, A., & Pieragostini, E. (2011).** Monitoring of genetic diversity in the endangered Martina Franca donkey population. *Journal of animal science*, *89*(5), 1304-1311.
386. **Robaire, B., & Hermo, L. (1988).** Efferent ducts, epididymis, and vas deferens: structure, functions, and their regulation. *The physiology of reproduction*, *1*, 999-1080.
387. **Rockström, J., Steffen, W., Noone, K., Persson, Å., Chapin, F. S., Lambin, E. F., ... & Foley, J. A. (2009).** A safe operating space for humanity. *Nature*, *461*(7263), 472-475.
388. **Rodríguez-Morales, O., Pedro-Martínez, E., Hernández-Pichardo, J. E., Alejandre-Aguilar, R., Aranda-Fraustro, A., Graullera-Rivera, V., & Arce-Fonseca, M. (2014).** Sperm morphological features associated with chronic Chagas disease in the semen of experimentally infected dogs. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, *91*(4), 810-815.
389. **Rooke, J. A., Shao, C. C., & Speake, B. K. (2001).** Effects of feeding tuna oil on the lipid composition of pig spermatozoa and in vitro characteristics of semen. *Reproduction-cambridge*, *121*(2), 315-322.
390. **Roux, C., Tripogney, C., Joanne, C., & Bresson, J. L. (2004).** Sperm chromatin packaging as an indicator of in-vitro fertilization rates. *Gynécologie Obstétrique et Fertilité*, *32*(9), 792-798.
391. **Sahi S., Louafi Nafaa., Bouzebda-Afri F., Bouzebda Z., Ouennes H., Hannani H., & Djaout A. (2018).** Seroprevalence de la brucelose caprine dans deux regions Touggourt et Biskra, 2^{ème} journées internationales vétérinaires, El Tarf, Algérie, le 16-17 Octobre 2018 .
392. **Sahi S. (2020).** *Les performances de production et de reproduction chez les caprins en Algérie*. Thèse de doctorat en sciences vétérinaires. Université de souk ahras.
393. **Sahi, S., Afri-Bouzebda, F., Bouzebda, Z., & Djaout, A. (2018).** Étude des mensurations corporelles de caprins dans le Nord-Est algérien. *Livestock Research for Rural Development*, *30*.
394. **Salamon, S., & Maxwell, W. M. C. (2000).** Storage of ram semen. *Animal reproduction science*, *62*(1-3), 77-111.

395. **Salhab, S. A., Zarkawi, M., Wardeh, M. F., Al-Masri, M. R., & Kassem, R. (2003).** Characterization and evaluation of semen in growing Awassi ram lambs. *Tropical animal health and production*, *35*(5), 455-463.
396. **Saling, P. M. (1981).** Involvement of trypsin-like activity in binding of mouse spermatozoa to zonae pellucidae. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *78*(10), 6231-6235.
397. **Salisbury, G. W., VanDemark, N. L., & Lodge, J. R. (1978).** *Physiology of reproduction and artificial insemination of cattle (No. Ed. 2)*. WH Freeman and Company.
398. **Salting, V. B., Aquino, F. P., Leoveras, M. E., Ocampo, L. C., & Leon, E. D. (2016).** Comparison of quality of spermatozoa from the excurrent ducts of Philippine local chicken retrieved by swim-up or mincing methods. *Journal of Biological Engineering Research and Review*, *3*(1), 1-5.
399. **Sangaré, M., Thys, E., & Gouro, A. S. (2005).** Alimentation des ovins de race locale: techniques d'embouche ovine, choix de l'animal et durée. *Synthèse du Centre International de Recherche-Développement sur l'Élevage en zone Subhumide (CIRDES), Burkina Faso, fiche, (13)*, 8.
400. **Santiago-Moreno, J., & Blesbois, E. (2020).** Functional Aspects of Seminal Plasma in Bird Reproduction. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(16), 5664. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms21165664>
401. **Santiago-Moreno, J., Astorga, R. J., Luque, I., Coloma, M. A., Toledano-Díaz, A., Pulido-Pastor, A., ... & López-Sebastián, A. (2009).** Influence of recovery method and microbial contamination on the response to freezing–thawing in ibex (*Capra pyrenaica*) epididymal spermatozoa. *Cryobiology*, *59*(3), 357-362.
402. **Santiago-Moreno, J., Castaño, C., Toledano-Díaz, A., Coloma, M. A., López-Sebastián, A., Prieto, M. T., & Campo, J. L. (2011).** Semen cryopreservation for the creation of a Spanish poultry breeds cryobank: optimization of freezing rate and equilibration time. *Poultry science*, *90*(9), 2047-2053.
403. **Santiago-Moreno, J., Esteso, M. C., Villaverde-Morcillo, S., Toledano-Déaz, A., Castaño, C., Velázquez, R., López-Sebastián, A., Goya, A. L., & Martínez, J. G. (2016).** Recent advances in bird sperm morphometric analysis and its role in male gamete characterization and reproduction technologies. *Asian journal of andrology*, *18*(6), 882–888. <https://doi.org/10.4103/1008-682X.188660>
404. **Santiago-Moreno, J., Toledano-Díaz, A., Pulido-Pastor, A., Gómez-Brunet, A., & López-Sebastián, A. (2006).** Birth of live Spanish ibex (*Capra pyrenaica hispanica*) derived from artificial insemination with epididymal spermatozoa retrieved after death. *Theriogenology*, *66*(2), 283-291.
405. **Sarsaifi, K., Vejayan, J., Yusoff, R., Hani, H., Rasoli, M., Omar, M. A., & Othman, A. M. (2015).** Protein profile and functionality of spermatozoa from two semen collection methods in Bali bulls. *Livestock Science*, *172*, 96-105.

406. Sasaki, K., Tatsumi, T., Tsutsui, M., Niinomi, T., Imai, T., Naito, M., ... & Nishi, Y. (2010). A method for cryopreserving semen from Yakido roosters using N-methylacetamide as a cryoprotective agent. *The journal of poultry science*, 1009030069-1009030069.
407. Sasanami, T., Matsuzaki, M., Mizushima, S., & Hiyama, G. (2013). Sperm storage in the female reproductive tract in birds. *Journal of Reproduction and Development*, 59(4), 334-338.
408. Savoyet Florine. (2018). *Guide pratique de consultation de la poule (Gallus Gallus)*, thèse présentée à l'université Claude-Bernard -Lyon I(Médecine -Pharmacie) par nouvel animal de compagnie VET AGRO SUP Campus vétérinaire de Lyon.
409. Schill, W. B. (1991). Some disturbances of acrosomal development and function in human spermatozoa. *Human Reproduction*, 6(7), 969-978.
410. Schmehl, M. K., Vazquez, I. A., & Graham, E. F. (1986). The effects of nonpenetrating cryoprotectants added to TEST-yolk-glycerol extender on the post-thaw motility of ram spermatozoa. *Cryobiology*, 23(6), 512-517.
411. Secal, R. S. L., Van derZwalmen, P., Nijs, M., & Bertin, G. (2012). Fertilisation ovocytaire par sperme épидидymaire et testiculaire, Bertin Hôpital van Helmont-Vilvoorde - Belgique; sur le site : <http://www.gyneweb.fr/Sources/revues/referenc/V1N3/fertilov.html>
412. Seifi-Jamadi, A., Kohram, H., Zareh-Shahne, A., Dehghanizadeh, P., & Ahmad, E. (2016). Effect of various concentrations of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene on freezing capacity of Turkman stallion sperm. *Animal reproduction science*, 170, 108-113.
413. Sellami, A., Chakroun, N., Ben Zarrouk, S., Sellami, H., Kebaili, S., Rebai, T., & Keskes, L. (2013). Assessment of chromatin maturity in human spermatozoa: useful aniline blue assay for routine diagnosis of male infertility. *Advances in urology*, 2013.
414. Senoussi A, Haili L et Maïz H A B. (2010). Situation de l'élevage bovin laitier dans la région de Guerrara (Sahara Septentrional Algérien). *Livestock Research for Rural Development*. 22 (12) 2010.
415. Setiadi, M. A. (2014). Motilitas dan keutuhan membran plasma spermatozoa epididimis kucing selama penyimpanan pada suhu 4 C. *Media Kedokteran Hewan*, 21(3).
416. Shakeri, M., Roshanfekar, H., Mamoei, M., & Mirzadeh, K. (2008). Effect of epididymis handling conditions on the quality of ram spermatozoa recovered post-mortem. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances*, 3(6), 400-408.
417. Shanmugam, M., Kannaki, T. R., & Vinoth, A. (2016). Comparison of semen variables, sperm DNA damage and sperm membrane proteins in two male layer breeder lines. *Animal reproduction science*, 172, 131-136.
418. Shanmugam, M., Kannaki, T. R., & Vinoth, A. (2016). Comparison of semen variables, sperm DNA damage and sperm membrane proteins in two male layer breeder lines. *Animal reproduction science*, 172, 131-136.

419. Shannon, P., & Curson, B. (1972). Toxic effect and action of dead sperm on diluted bovine semen. *Journal of dairy science*, *55*(5), 614-620.
420. Sieme, H., Oldenhof, H., & Wolkers, W. F. (2015). Sperm membrane behaviour during cooling and cryopreservation. *Reproduction in Domestic Animals*, *50*, 20-26.
421. Sikka, S. C., Rajasekaran, M. A. H. A. D. E. V. A. N., & Hellstrom, W. J. (1995). Role of oxidative stress and antioxidants in male infertility. *Journal of andrology*, *16*(6), 464-468.
422. Silva, E. C. B., Arruda, L. C. P., Silva, S. V., Souza, H. M., & Guerra, M. M. P. (2016). High resveratrol or quercetin concentrations reduce the oscillation index of frozen goat semen. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, *68*(5), 1237-1243.
423. Silva, E. C. B., Cajueiro, J. F. P., Silva, S. V., Soares, P. C., & Guerra, M. M. P. (2012). Effect of antioxidants resveratrol and quercetin on in vitro evaluation of frozen ram sperm. *Theriogenology*, *77*(8), 1722-1726.
424. Silva, K. M. G., Moraes, T. A. P., Silva, E. C. B., Gamboa, S. C., & Guerra, M. M. P. (2009). Effect of trolox and pentoxifylline on motility and integrity of, acrossome and DNA of equine spermatozoa after thawing. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, *61*(1), 42-49.
425. Silva, S. V., & Guerra, M. M. P. (2011). Efeitos da criopreservação sobre as células espermáticas e alternativas para redução das crioinjúrias. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, *35*(4), 370-384.
426. Silva, S. V., Soares, A. T., Batista, A. M., Almeida, F. C., Nunes, J. F., Peixoto, C. A., & Guerra, M. M. P. (2013). Vitamin E (Trolox) addition to Tris-egg yolk extender preserves ram spermatozoon structure and kinematics after cryopreservation. *Animal reproduction science*, *137*(1-2), 37-44.
427. Simões, K., Orsi, A. M., Artoni, S. M. B., Cruz, C. da, Schimming, B. C., & Pinheiro, P. F. F. (2004). Structural features of the epididymal region of the domestic duck (*Anas platyrhynchos*). *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, *41*(2), 92-97
428. Sinha, M. P., Sinha, A. K., Singh, B. K., & Prasad, R. L. (1996). The effect of glutathione on the motility, enzyme leakage and fertility of frozen goat semen. *Animal reproduction science*, *41*(3-4), 237-243.
429. Siudzińska, A., & Łukaszewicz, E. (2008). The effect of breed on freezability of semen of fancy fowl. *Animal Science Papers and Reports*, *26*(4), 331-340.
430. Smadi Mustapha Adnane., Ouennes H., Rahal O., Mezded M., Medjdoub S., Aroui D., Sedira CH., Aissouss R., Lamamria R., Benhenia K., Chacha F., Rahab H., Boughrisse F., & Meziane R. (2018). Influence du protocole d'insémination à l'aveugle dans la réussite du transfert d'embryons in vivo chez la vache laitière, 2^{ème} journées internationales vétérinaires, El Tarf, Algérie, le 16-17 Octobre 2018.

431. Snyder, N. F., Derrickson, S. R., Beissinger, S. R., Wiley, J. W., Smith, T. B., Toone, W. D., & Miller, B. (1996). Limitations of captive breeding in endangered species recovery. *Conservation biology*, *10*(2), 338-348.
432. Sobeh, M., Hassan, S. A., El Raey, M. A., Khalil, W. A., Hassan, M. A., & Wink, M. (2017). Polyphenolics from *Albizia harveyi* exhibit antioxidant activities and counteract oxidative damage and ultra-structural changes of cryopreserved bull semen. *Molecules*, *22*(11), 1993.
433. Soler, A. J., García, A. J., Fernández-Santos, M. R., Estes, M. C., & Garde, J. J. (2003). Effects of thawing procedure on postthawed in vitro viability and in vivo fertility of red deer epididymal spermatozoa cryopreserved at -196°C. *Journal of andrology*, *24*(5), 746-756.
434. Soler, A. J., Pérez-guzmán, M. D., & Garde, J. J. (2003). Storage of red deer epididymides for four days at 5°C: effects on sperm motility, viability, and morphological integrity. *Journal of Experimental Zoology Part A: Comparative Experimental Biology*, *295*(2), 188-199.
435. Soranzo, L., Dadoune, J. P., & Marcelle-Anne, F. M. (1982). La segmentation du canal épидидymaire chez la souris: étude ultrastructurale. *Reproduction Nutrition Développement*, *22*(6), 999-1012.
436. Stout, M. A. (2012). Comparison of epididymal and ejaculated sperm collected from the same holstein bulls. *LSU Doctoral Dissertations*. 1160.
437. Suleiman, S. A., Ali, M. E., Zaki, Z. M. S., El-Malik, E. M. A., & Nasr, M. A. (1996). Lipid peroxidation and human sperm motility: protective role of vitamin E. *Journal of andrology*, *17*(5), 530-537.
438. Suleiman, S. A., Ali, M. E., Zaki, Z. M. S., El-Malik, E. M. A., & Nasr, M. A. (1996). Lipid peroxidation and human sperm motility: protective role of vitamin E. *Journal of andrology*, *17*(5), 530-537.
439. Sullivan, R., & Mieusset, R. (2016). The human epididymis: its function in sperm maturation. *Human reproduction update*, *22*(5), 574-587.
440. Sullivan, R., Frenette, G., & Girouard, J. (2007). Epididymosomes are involved in the acquisition of new sperm proteins during epididymal transit. *Asian journal of andrology*, *9*(4), 483-491.
441. Surachman, M., Rizal, M., & Maheshwari, H. (2009). Kualitas Semen Cair Asal Epididimis Kerbau Belang dalam Bahan Pengencer Andromed yang Mendapat Penambahan Sukrosa. *Media Peternakan*, *32*(2), 88-94.
442. Swain, D. K., Tarai, A., Mohapatra, A. P. K., & Kundu, A. K. (2011). Evaluation of longevity of canine epididymal spermatozoa stored at 4°C. *Indian Journal of Veterinary Research*, *20*(1), 16-20.
443. Tabatabaei, S., Batavani, R. A., & Talebi, A. R. (2009). Comparison of semen quality in indigenous and Ross broiler breeder roosters. *J. Anim. Vet. Adv.*, *8*(1), 90-93.

444. Taberlet, P., Coissac, E., Pansu, J., & Pompanon, F. (2011). Conservation genetics of cattle, sheep, and goats. *Comptes rendus biologiques*, *334*(3), 247-254.
445. Taberlet, P., Valentini, A., Rezaei, H. R., Naderi, S., Pompanon, F., Negrini, R., & Ajmone-Marsan, P. (2008). Are cattle, sheep, and goats endangered species?. *Molecular ecology*, *17*(1), 275-284.
446. Taepongsorat, L., Tangpraprutgul, P., Kitana, N., & Malaivijitnond, S. (2008). Stimulating effects of quercetin on sperm quality and reproductive organs in adult male rats. *Asian journal of andrology*, *10*(2), 249-258.
447. Tajik, P., & Hasan, N. L. M. (2008). Assessment of epididymal sperm obtained from dromedary camel. *Iranian Journal Of Veterinary Research*, *9* (1), 46-50.
448. Tamayo-Canul, J., Alvarez, M., López-Urueña, E., Nicolas, M., Martinez-Pastor, F., Anel, E., ... & De Paz, P. (2011). Undiluted or extended storage of ram epididymal spermatozoa as alternatives to refrigerating the whole epididymes. *Animal reproduction science*, *126*(1-2), 76-82.
449. Tamayo-Canul, J., Alvarez, M., López-Urueña, E., Nicolas, M., Martinez-Pastor, F., Anel, E., ... & De Paz, P. (2011). Undiluted or extended storage of ram epididymal spermatozoa as alternatives to refrigerating the whole epididymes. *Animal reproduction science*, *126*(1-2), 76-82.
450. Tanchev, S. (2015). Conservation of genetic resources of autochthonous domestic livestock breeds in Bulgaria. A review. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, *21*(6), 1262-1271.
451. Tarai, A., Swain, D. K., Mohapatra, A. P. K., & Kundu, A. K. (2010). Longevity of canine cauda epididymal spermatozoa. *Indian Veterinary Journal*, *87*(12), 1198-1200.
452. Tarif, A. M., Bhuiyan, M. M. U., Ferdousy, R. N., Juyena, N. S., & Mollah, M. B. R. (2013). Evaluation of semen quality among four chicken lines. *IOSR J. Agric. Vet. Sci*, *6*(5), 7-13.
453. Taylor, K., Roberts, P., Sanders, K., & Burton, P. (2009). Effect of antioxidant supplementation of cryopreservation medium on post-thaw integrity of human spermatozoa. *Reproductive biomedicine online*, *18*(2), 184-189.
454. Tchoumboué, J., Manjeli, Y., Téguia, A., & Ewane, N. J. (2000). Productivité et effets comparés de trois systèmes de conduite de l'élevage sur les performances de l'aviculture villageoise dans les hautes terres de l'Ouest-Cameroun. *Science Agronomique et développement*, *2*(1), 6-14.
455. Tebet, J. M., Martins, M. I. M., Chirinea, V. H., Souza, F. F. D., Campagnol, D., & Lopes, M. D. (2006). Cryopreservation effects on domestic cat epididymal versus electroejaculated spermatozoa. *Theriogenology*, *66*(6-7), 1629-1632.
456. Terrill, C. E. (1940). Comparison of ram semen collection obtained by three different methods for artificial insemination. *Journal of Animal Science*, *1940*(1), 201-207.

457. Thériault, M., François, C., & Element-Boulianne, C. (2012). Amélioration de la productivité des troupeaux ovins par le contrôle de la reproduction des béliers Projet 6349, Raport Final, sur le site : www.ovins.fsaa.ulaval.ca
458. Thimonier, J., Cognié, Y., Lassoued, N., & Khaldi, G. (2000). L'effet mâle chez les ovins : une technique actuelle de maîtrise de la reproduction. *INRA .Prod. Anim*, **13** (4), 223-231.
459. Thuwanut, P., Chatdarong, K., Techakumphu, M., & Axner, E. (2008). The effect of antioxidants on motility, viability, acrosome integrity and DNA integrity of frozen-thawed epididymal cat spermatozoa. *Theriogenology*, **70**(2), 233-240.
460. Tibary, A., Boukhliq, R., Adnani, M., & Toe, F. (1988). Importance de l'examen du belier en gestion de la reproduction ovine: Variations physiologiques de la qualite du sperme et dominantes pathologiques. *XVIII^{me} Jourdes de l'Association Nationale pour la Production Animale (ANPA)*.
461. Tingari, M. D. (1971). On the structure of the epididymal region and ductus deferens of the domestic fowl (*Gallus domesticus*). *Journal of Anatomy*, **109**(Pt 3), 423-435.
462. Tisdell, C. (2003). Socioeconomic causes of loss of animal genetic diversity: analysis and assessment. *Ecological Economics*, **45**(3), 365-376.
463. Tsikis, G., Reynaud, K., Ferchaud, S., & Druart, X. (2018). Seminal plasma differentially alters the resistance of dog, ram and boar spermatozoa to hypotonic stress. *Animal reproduction science*, **193**, 1-8.
464. Tsutsui, T., Wada, M., Anzai, M., & Hori, T. (2003). Artificial insemination with frozen epididymal sperm in cats. *Journal of veterinary medical science*, **65**(3), 397-399.
465. Tuncer, P. B., Kinet, H., & Özdoğan, N. (2008). Evaluation of some spermatological characteristics in Gerze cocks. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, **55** : 99-102.
466. Turri, F. E. D. E. R. I. C. A., Madeddu, M., Gliozzi, T. M., Gandini, G., & Pizzi, F. (2012). Influence of recovery methods and extenders on bull epididymal spermatozoa quality. *Reproduction in domestic animals*, **47**(5), 712-717.
467. Turri, F., Madeddu, M., Gliozzi, T. M., Gandini, G., & Pizzi, F. (2014). Effect of testicle postmortem storage on goat frozen-thawed epididymal sperm quality as a tool to improve genebanking in local breeds. *animal*, **8**(3), 440-447.
468. Van der Ven, H. H., Kaminski, J., Bauer, L., & Zaneveld, L. J. (1985). Inhibition of human sperm penetration into zona-free hamster oocytes by proteinase inhibitors. *Fertility and sterility*, **43**(4), 609-616.
469. Van Wagendonk-de Leeuw, A. M., Haring, R. M., Kaal-Lansbergen, L. M. T. E., & Den Daas, J. H. G. (2000). Fertility results using bovine semen cryopreserved with extenders based on egg yolk and soybean extract. *Theriogenology*, **54**(1), 57-67.
470. Varisli, O., Uguz, C., Agca, C., & Agca, Y. (2009). Motility and acrosomal integrity comparisons between electro-ejaculated and epididymal ram sperm after exposure to a

range of anisotonic solutions, cryoprotective agents and low temperatures. *Animal Reproduction Science*, **110**(3-4), 256-268.

- 471. Varisli, O., Uguz, C., Agca, C., & Agca, Y. (2009).** Motility and acrosomal integrity comparisons between electro-ejaculated and epididymal ram sperm after exposure to a range of anisotonic solutions, cryoprotective agents and low temperatures. *Animal Reproduction Science*, **110**(3-4), 256-268.
- 472. Vatta, A. F., Abbot, M. A., Villiers, J. F., Gumede, S. A., Harrison, L. J. S., Krecke, R. C., ... & Pearson, R. A. (2006).** Goat keepers' animal health care manual. *Agricultural Research Council. Onderstepoort Veterinary Institute with KwaZulu-Natal Department of Agriculture and Environment, South Africa*, 60.
- 473. Verdier, Y. (2002).** *Sélection, identification et caractérisation partielle d'antigènes du spermatozoïde du renard (Vulpes vulpes) en vue de leur utilisation dans un vaccin contraceptif* (Doctoral dissertation, Université Henri Poincaré-Nancy 1).pp(38).
- 474. Verma, O. P., Kumar, R., Kumar, A., & Chand, S. (2012).** Assisted Reproductive Techniques in Farm Animal-From Artificial Insemination to Nanobiotechnology. *Veterinary World*, **5**(5), 301-310.
- 475. Vichas, L., Tsakmakidis, I. A., Vafiadis, D., Tsousis, G., Malama, E., & Boscos, C. M. (2018).** The effect of antioxidant agents' addition and freezing method on quality parameters of frozen thawed ram semen. *Cell and tissue banking*, **19**(1), 113–121.
- 476. Vieira, L. A., Gadea, J., García-Vázquez, F. A., Avilés-López, K., & Matás, C. (2013).** Equine spermatozoa stored in the epididymis for up to 96 h at 4 C can be successfully cryopreserved and maintain their fertilization capacity. *Animal reproduction science*, **136**(4), 280-288.
- 477. Villaverde-Morcillo, S., Esteso, M. C., Castaño, C., & Santiago-Moreno, J. (2016).** Influence of Post-Mortem Sperm Recovery Method and Extender on Unstored and Refrigerated Rooster Sperm Variables. *Reproduction in Domestic Animals*, **51**(1), 40-46.
- 478. Voglmayr, J. K., Musto, N. A., Saksena, S. K., Brown-Woodman, P. D. C., Marley, P. B., & White, I. G. (1977).** Characteristics of semen collected from the cauda epididymidis of conscious rams. *Reproduction*, **49**(2), 245-251.
- 479. Watson, P. F. (1975).** Use of a Giemsa stain to detect changes in acrosomes of frozen ram spermatozoa. *The Veterinary Record*, **97**(1), 12-15.
- 480. Watson, P. F. (2000).** The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal reproduction science*, **60**, 481-492.
- 481. Weiss, R. R., Muradas, P. R., Graneman, L. C., & Meira, C. D. (2008).** Freezing sperm from cauda epididymis of castrated stallions. *Animal Reproduction Science*, **107**, 302-360.
- 482. Woelders, H., Zuidberg, C. A., & Hiemstra, S. J. (2006).** Animal genetic resources conservation in the Netherlands and Europe: poultry perspective. *Poultry science*, **85**(2), 216-222.

483. Yakhlef, H., Ghozlane, F., & Benamara, B. A. (2003). Diversité des pratiques d'élevage bovin à viande dans le massif du Dahra (Algérie). *Revue Marocaine des Sciences Agronomiques et Vétérinaires*, *23*(2), 153-162.
484. Yániz, J. L., Palacín, I., Vicente-Fiel, S., Sánchez-Nadal, J. A., & Santolaria, P. (2015). Sperm population structure in high and low field fertility rams. *Animal Reproduction Science*, *156*, 128-134.
485. Young, C., Curtis, M., Ravida, N., Mazotti, F., & Durrant, B. (2014). 109 Development of a sperm cryopreservation protocol for the argentine black and white tegu (*Tupinambis Merianae*). *Reproduction, Fertility and Development*, *26*(1), 168-169.
486. Yulnawati, Y., Maheshwari, H., & Rizal, M. (2009). Viability and plasma membrane integrity of the spotted buffalo epididymal spermatozoa after thawing with the addition of dextrose into the extender. *Biotropia-The Southeast Asian Journal of Tropical Biology*, *16*(1), 21 – 27.
487. Zaidi, R., & Hadi, S. M. (1992). Strand scission in DNA by Gossypol and Cu (II): Role of Cu (I) and oxygen-free radicals. *Journal of biochemical toxicology*, *7*(4), 213-217.
488. Zanetti, E., De Marchi, M., Abbadì, M., & Cassandro, M. (2011). Variation of genetic diversity over time in local Italian chicken breeds undergoing in situ conservation. *Poultry science*, *90*(10), 2195-2201.
489. Zhang, Y. M. C. (2005). Protective effect of quercetin on Aroclor 1254–induced oxidative damage in cultured chicken spermatogonial cells. *Toxicological Sciences*, *88*(2), 545-550.
490. Zhu, Z., Fan, X., Lv, Y., Zhang, N., Fan, C., Zhang, P., & Zeng, W. (2015). Vitamin E analogue improves rabbit sperm quality during the process of cryopreservation through its antioxidative action. *PloS one*, *10* (12), e0145383.

Sitographie

1. <http://www.gaia.be/fr/actualite/du-couvoir-labattoir-courte-vie-des-poulets-chair-est-enfe>.
2. <https://www.crbt.dz>.
3. <https://fr.dreamstime.com/mol%C3%A9cule-flavono%C3%AFde-querc%C3%A9tine-formule-chimique-structurelle-image-121671580>.
4. <https://www.molinstincts.com/image/R-TROLOX-img-CT1001017787>.
5. <https://www.arcane-industries.fr/details-acide+tannique+et+tanin-120.html>.
6. <https://www.algerie-dz.com/L-Algerie-veut-creer-une-banque-de-genes-vegetaux-et-animaux.html>.
7. <https://www.algerie360.com/securite-alimentaire-une-banque-algerienne-de-genes-danimaux-et-de-vegetaux-en-2014>.

Annexes



Résumé

L'objectif de notre projet est de contribuer au domaine de la cryoconservation du sperme épидидymaire et de définir les particularités d'espèces pour faciliter l'aboutissement de la cryoconservation et la mise en place d'une banque cryogénique des populations animales locales menacées de disparition par l'infusion croissante de races exotiques plus performantes ou celles menacées par les facteurs environnementaux. Trois volets ont été abordés avant de contribuer à la création d'une banque nationale de sperme épидидymaire :

La première expérimentation était d'examiner pour la première fois les caractéristiques et la conservation des spermatozoïdes post-mortem, obtenus à partir de l'épididyme et du canal déférent de coqs adultes de population locale. Comparer la qualité du sperme au niveau de l'épididyme et du canal déférent. Déterminer l'efficacité de deux techniques de prélèvement de sperme post-mortem et l'effet de la conservation in situ à différentes températures (2h et 24h à 20°C et après réfrigération à 4°C pendant 24h).

La deuxième expérience a permis d'évaluer la qualité en pré congélation et en post congélation du sperme épидидymaire du bouc local en fonction de la température de stockage des testicules et du temps écoulé entre la mort de l'animal et la récupération du sperme (0, 24, 48,72 h), pour établir les protocoles optimaux de la cryoconservation du sperme épидидymaire dans cette espèce. Un troisième volet, une comparaison de l'effet de l'inclusion de 5 $\mu\text{g/ml}$ de trois antioxydants dans le dilueur de congélation de sperme épидидymaire de taureau locale : La quercétine, le trolox et l'acide tannique.

Selon les résultats obtenus, on peut conclure que des échantillons de sperme de bonne qualité peuvent être collectés à partir du canal déférent avec la méthode de rinçage, et que le sperme chez le coq local peut être conservé in situ à 20°C pendant 24h sans altération de la qualité spermatique. Chez le bouc local, la température ambiante (21.5°C) et de réfrigération (4°C) des spermatozoïdes, permettent de maintenir jusqu'à 48 heures après la mort, une très bonne qualité de sperme épидидymaire de bouc avant sa congélation. La cryoconservation du sperme épидидymaire de bouc, conservé in situ pendant 48h à 4°C n'a pas influencé d'une façon significative les paramètres spermatiques : la motilité, la mobilité progressive, la viabilité, l'intégrité acrosomique, l'intégrité de la membrane et le taux d'anomalies. L'ajout des antioxydants aux dilueurs a démontré qu'il existe une grande différence significative ($p < 0.001$) entre le témoin et les autres antioxydants alors qu'il n'y a pas de différences entre les trois antioxydants. Avec des valeurs meilleures dans les deux milieux de dilution avec le trolox et la quercétine pour l'ensemble des valeurs chez l'espèce bovine.

Finalement un total de 1879 doses de sperme, a été cryoconservé auprès d'un total de 41 donneurs de races locales (bovins, caprins, ovins, coqs) comme première démarche pour la mise en place d'une banque génétique de sperme épидидymaire. Les difficultés rencontrées et les recommandations pour faire aboutir notre projet de mettre sur pied une cryobanque pour les populations animales locales sont présentées.

Mots clés. Algérie, banque génétique, conservation, cryoconservation, population locale, sperme épидидymaire.

OUENNES Houria

Adresse professionnelle : Département des Sciences Vétérinaires, Institut des Sciences Agronomiques et Vétérinaires Taoura, Université Mohammed Chérif Messaadia, Bp.1553, 41000, Souk-Ahras, Algérie.

Email : houriavet19@gmail.com

Tel : + 213 77 728 02 75