



**République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Abderrahmane Mira de Bejaia
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Microbiologie**

Mémoire de fin de cycle

En vue de l'obtention du Master en Microbiologie Moléculaire et Médicale

Thème

Etude de l'effet des bactéries sensibles et résistantes sur les paramètres de mobilité spermatique in vitro.

Présenté par :

Melle Bouchal lamia

Melle Khima nawel

Devant le jury :

Pr. TOUATIA

Président

Pr. IGUEROUADA.M

Promoteur

Dr. AYAD.A

Examineur

Dr. Bendjedou.K

Examineur

Année 2013/2014



جامعة بجاية
Tasdawit n' Bgayet
Université de Béjaïa

Remerciement

«Louange à Allah, le tout puissant et miséricordieux qui nous a prodigué le courage et la force afin de mener à terme notre travail».

La réalisation de notre étude et la rédaction de notre mémoire ne seraient pas achevées sans l'aide de personnes que nous avons trouvées à nos côtés.

On exprime nos plus vifs remerciements à monsieur IGUEROUADA.M, pour son encadrement scientifique, ses conseils pertinents. Merci de nous avoir guidés avec patience et d'avoir consacré autant d'heures pour les corrections de ce manuscrit, pour sa grande rigueur scientifique et ses conseils avisés. On le remercie profondément de nous avoir procuré un encadrement rigoureux et si précieux. Nous vous souhaitons, monsieur, que du succès et de bonheur.

Nous tenons à remercier notre Co-promotrice melle MEZHOUD , pour avoir accepté de nous encadrer ainsi que pour ses conseils et ses orientations.

Les membres du jury pour l'examination et l'évaluation de notre travail

Tous ceux et celles qui nous ont aidé de près ou de loin dans la réalisation de notre mémoire.

Dédicaces

Avant tout, je remercie le Dieu tout puissant, qui m'a donné la Volonté, le courage et la patience et qui a guidé mes pas vers le droit chemin durant mes années d'études.

Ce modeste travail est dédié à :

Ma chère mère, que je ne cesse de remercier pour tout ce qu'elle m'a donné. Tu es l'exemple de dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi .puisse dieu , le tout puissant, te préserver et t'accorder santé, longue vie et bonheur ;

Mon cher père, qui a toujours cru en moi et a mis à ma disposition tous les moyens nécessaires pour que je réussisse dans mes études ;

Tous les mots du monde ne Peuvent exprimer l'amour et le respect que je leur porte, Que ce travail leur apporte joie et fierté et qu'il soit le fruit de leur éducation, conseils et encouragement ;

A ma sœur Dida, et mon frère Sofiane les mots ne suffisent guère pour exprimer l'attachement, l'amour et l'affection que je vous porte, je vous dédie ce travail avec tous mes vœux de bonheur, de santé et de réussite ;

A la mémoire de ma grand mère Djamila, que dieu puisse te recevoir en son vaste paradis.

A mon oncle Mohand et sa femme Kahina

Je le dédie aussi à toute mes tantes, en particulier mes adorables : Yacine, Rayane, Amine et ma poupée Alicia.

A ceux qui me sont chers, que j'aime et qui m'aiment : surtout Moho ;

A toutes mes amies et a ma binôme nawel et sa famille ;

A tout les professeurs et les étudiants de la promotion de « microbiologie Appliquée 2014 » ;

Lamia

Dédicaces

Avant tout, je remercie le Dieu tout puissant, qui m'a donné la Volonté, le courage et la patience et qui a guidé mes pas vers le droit chemin durant mes années d'études.

Ce modeste travail est dédié à :

Ma chère mère, que je ne cesse de remercier pour tout ce qu'elle m'a donné. Tu es l'exemple de dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi .puisse dieu , le tout puissant, te préserver et t'accorder santé, longue vie et bonheur ;

Mon cher père, qui a toujours cru en moi et a mis à ma disposition tous les moyens nécessaires pour que je réussisse dans mes études ;

A mon unique frère amine, les mots ne suffisent guère pour exprimer l'attachement, l'amour et l'affection que je te porte, je te dédie ce travail avec tous mes vœux de bonheur, de santé et de réussite ;

A la mémoire de ma grand mère Zahra, que dieu puisse te recevoir en son vaste paradis ;

A ma très chère grand-mère Fatima et mes grands-père Said et Sadek , que dieu vous garde pour nous , merci pour vos prières et vos encouragements.

Je le dédie aussi à tous mes oncles et tantes, cousins et cousines paternel et maternel et leurs conjoints, en particulier Hayette , Nora ,Hakima ,Karima,Wassila ,Nassima, , Anis, Lycia ;

A toutes mes amies et a ma binôme Lamia et sa famille ;

A tout les professeurs et les étudiants de la promotion de « microbiologie Appliquée 2014 » ; et à ceux qui me sont chers, que j'aime et qui m'aime et à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin pour la réalisation de ce travail.

Nawel

Sommaire

Liste des abréviations

Liste des figures

Introduction.....1

Matériel & méthodes

I. Matériel

I.1. Matériels consommables.....	6
I.2. Matériels non consommable.....	6
I.3. Réactifs chimiques.....	6
I.4. Matériel biologique.....	6
I.5. Matériel d'analyse.....	7

II. Méthodes

II.1. Collecte de la semence de bovin.....	8
II.2. Infection du sperme.....	9
II.2.1. Souches bactériennes.....	9
II.2.2. Identification des souches.....	11
II.2.3. Préparation des échantillons de sperme infecté.....	11
II.2.4. Analyse aidée par ordinateur de la semence (CASA).....	12
II.2.5. Analyse statistique.....	12

Résultats

I. Identification des souches.....	13
II. Impacte des bactéries sur la semence.....	13
II. 1. l'évolution de la motilité spermatique.....	13
II. 2. Vitesse de progression linéaire.....	17
Discussion & conclusion.....	19

Références bibliographiques

Annexes

Liste des abréviations

ALH: Amplitude of Lateral Head displacement.

ATCC: *Escherichia coli* de référence.

BLSE: beta-lactamase a spectre étendu.

CASA: Computer Assisted Sperm Analysis.

CTX-M + TEM (Q): beta-lactamase a spectre étendu de type CTX-M et TEM isolée du coq.

E.coli: *Escherichia coli*.

ETEC: *E. coli* Entérotoxinogène.

EPEC : *E. coli* Entéro pathogène.

Fig : Figure

F V: Facteur de Virulence.

H BLSE + FQR: souche humaine résistante aux beta-lactamines a spectre étendu et aux fluoroquinolones.

H BLSE + QNR +FQR: souche humaine résistante aux beta-lactamines a spectre étendu, aux quinolones et aux fluoroquinolones.

H Qnr: souche humaine résistante aux quinolones.

MS: Mobilité Spermatique.

NR: Nitrate Réductase

% MS: pourcentage de la mobilité spermatique.

R: souche résistante.

S: Souche sensible.

S H: Sensible Homme.

SPZ: Spermatozoïde.

S Q: Sensible Coq.

TEM: témoin.

VP: Voges-Proskauer

VAP: Velocity Average Pathway.

VCL: Curvilinear Velocity.

VSL: Velocity Straight Line.

VSL: vitesse linéaire progressif des spermatozoïdes.

Fig 1 : Image de l'analyseur informatique de sperme (CASA).....	8
Fig 2 : Image d'un testicule bovin.....	8
Fig 3 : Image de l'épididyme juste après sa dissection et sa séparation du testicule.....	9
Fig 4 : Récolte de la semence par la méthode rétrograde.....	9
Fig 5 : recueil de la semence dans un tube eppendorf.....	10
Fig 6 : Image de lame de MAKLER.....	12
Fig 7 : Courbes représentant l'évolution de la mobilité du sperme humain en présence de bactéries isolées chez l'homme.....	14
Fig 8 : Courbes représentant l'évolution de la mobilité du sperme bovin en présence de bactéries isolées chez l'homme.....	14
Fig 9 : Courbes représentant l'évolution de la mobilité du sperme humain en fonction de la sensibilité et la résistance des bactéries isolées chez l'homme.....	15
Fig 10 : Courbes représentant l'évolution de la mobilité du sperme bovin en fonction de la sensibilité et la résistance des bactéries isolées chez l'homme.....	15
Fig 11 : Courbes représentant l'évolution de la mobilité du sperme humain en présence de bactéries isolées chez le coq.....	16
Fig 12 : Courbes représentant l'évolution de la mobilité du sperme bovin en présence de bactéries isolées chez le coq.....	16
Fig 13 : Courbes représentant l'évolution de la mobilité du sperme humain en fonction de la sensibilité et la résistance des bactéries isolées chez le coq.....	17
Fig 14 : Courbes représentant l'évolution de la mobilité du sperme bovin en fonction de la sensibilité et la résistance des bactéries isolées chez le coq.....	17
Fig 15 : Histogramme représentant l'évolution la vitesse de progression linéaire du sperme humain en présence de bactéries isolées chez l'homme.....	18

Liste des figures

- Fig 16** : Histogramme représentant l'évolution la vitesse de progression linéaire du sperme bovin en présence de bactéries isolées chez l'homme.....**18**
- Fig 17** : Histogramme représentant l'évolution la vitesse de progression linéaire du sperme humain en présence de bactéries isolées chez le coq.....**18**
- Fig 18** : Histogramme représentant l'évolution la vitesse de progression linéaire du sperme bovin en présence de bactéries isolées chez le coq.....**18**

INTRODUCTION

La diminution de l'infertilité masculine due à l'altération de la qualité du sperme au cours de ces dernières décennies a fait l'objet de nombreux débats parmi les chercheurs et a suscité l'intérêt de beaucoup de scientifiques. C'est ainsi que plusieurs publications scientifiques se sont consacrées à différents aspects et plus particulièrement à ceux relatifs aux facteurs altérants la qualité du sperme. L'infertilité masculine est souvent évaluée par des paramètres de la qualité du sperme tels que la concentration des spermatozoïdes, la viabilité et la motilité. Les cellules reproductrices de l'homme, dites spermatozoïdes, sont des cellules mobiles qui se déplacent grâce un flagelle, la production des spermatozoïdes se fait de manière continue depuis la puberté jusqu'à la mort et se déroule dans les testicules. Chacun de ces gonades contient de nombreux tubes séminifères où la formation d'un spermatozoïde dure 64 jours. Ces gamètes deviennent mobiles dans l'épididyme où ils séjournent environ deux semaines (Descamps, 2004).

Le spermatozoïde humain est caractérisé par une tête constituée par une membrane, un noyau, un cytoplasme, une pièce intermédiaire et un flagelle. Chaque éjaculat contient 200 à 300 millions de spermatozoïdes avec un volume de 2 ml et un pH de 7. Lors de l'éjaculation, des contractions chassent le sperme dans l'urètre (un canal commun à l'appareil urinaire et à l'appareil reproducteur) jusqu'à l'orifice urogénital et lorsque il parcourt les voies spermatiques (épididyme, canal déférent), puis les voies urinaires (urètre), il peut se charger de bactéries urovésicales (Haines et al., 2013).

Les infections de l'appareil uro-génital masculin représentent un problème de santé majeur et compte pour près de 15 % des cas d'infertilité masculine (Cabannes, 2008). Les infections peuvent affecter les différents sites de l'appareil reproducteur masculin, comme les testicules, l'épididyme, et les glandes sexuelles. Généralement les infections du tractus génital commencent dans la partie inférieure (urètre), si elles ne sont pas traitées, elles peuvent remonter par le canal déférent vers les parties supérieures (épididyme et testicules, où est produit le sperme) (Prabha et al., 2010). Les spermatozoïdes peuvent être, ensuite, affectés par des infections à différents stades de leur développement. Les infections aiguës ou chroniques peuvent compromettre la spermatogenèse, résultant en des réductions quantitatives et qualitatives (Keck et al., 1998), ou à une altération de la fonction des spermatozoïdes. Dans certains cas la détection de bactéries dans le sperme ne signifie pas

nécessairement une infection, elle peut représenter une contamination ou une colonisation sans apparition de signes de dysfonctionnement (Prabha et al., 2010).

Les infections masculines aiguës agissent sur la fécondance par les lésions épithéliales qu'elles provoquent, et les anticorps anti-spermatozoïdes sont plus fréquemment détectés dans la population masculine avec des antécédents infectieux. Les infections chroniques se traduisent par tout un processus inflammatoire généré par les toxines bactériennes et les cytokines, elles entraînent des scléroses des voies génitales par fibrose des conduits avec parfois obstruction canalaire secondaire où des stases diminuant le nombre, et/ou la mobilité, et/ou la vitalité des spermatozoïdes dans l'éjaculat (AL-Husseiny, 2011). Les micro-organismes infectieux sont susceptibles de provoquer des lésions tissulaires (épithélium et tissu conjonctif sous jacent) soit directement, soit par l'intermédiaire de leurs produits de sécrétion. L'inflammation résulte aussi du nombre de leucocytes activés et des cytokines qu'ils sécrètent. Les radicaux libres oxygénés libérés par ces cellules sont actuellement considérés comme une source d'altération membranaire et nucléaire des spermatozoïdes. Des signes indirects d'infection peuvent être détectés par des examens classiques de spermiologie comme la modification du volume et du pH du sperme, et celle de la mobilité et de la vitalité des spermatozoïdes (Keck et al., 1998).

Les espèces bactériennes qui interagissent avec les spermatozoïdes sont des agents pathogènes responsables bien connus des infections urogénitales, tels que *Escherichia coli*, *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis*, et *Chlamydia trachomatis* (Putin et al., 2010).

E. coli représente probablement le micro-organisme le plus fréquemment isolé dans les infections des voies urinaires par contamination via la flore fécale, il représente une part allant de 60 à 80 %. Il représente le micro-organisme principale provoquant la prostatite et l'épididymite Il est rarement responsables d'infections asymptomatiques, il est surtout lié à des prostatites chroniques avec 90% des cas dues à des infections communautaires et 50 % dues à des infection nosocomiales (Cohen-Bacrie et al., 2009)., *E. coli* est réputée d'avoir une influence négative sur la motilité et la morphologie du sperme (Sepúlveda et al., 2013). L'hémolysine semble être impliquée dans le mécanisme moléculaire qui produit la rupture de la membrane du sperme humain, l'acidification du milieu, en raison du métabolisme bactérien, peut être un autre élément qui pourrait expliquer la diminution de la qualité du sperme (Prabha et al., 2009). Plusieurs rapports décrivent l'agglutination des spermatozoïdes avec immobilisation par *E. coli* (Huwe et al., 1998; Khalili et al., 2001). Paulson & Polakoski

(1977) ont étudié le mécanisme par lequel *E. coli* immobilise les spermatozoïdes et ils ont rapporté un facteur, apparemment excrété par les bactéries, qui immobilise les spermatozoïdes sans agglutination. Cependant, Diemer et al. (1996) ont rapporté que *E. coli* inhibe la motilité des spermatozoïdes en s'adhérant à ces derniers (Prabha et al., 2009).

E. coli présente une résistance naturelle aux glycopeptides et à la pénicilline G. Elle appartient avec *Proteus mirabilis*, *Salmonella*, et *Shigella*, au groupe 1 des entérobactéries. Toutes ces espèces sont naturellement sensibles à l'ensemble des β lactamines, mais certaines souches ont acquis de nouveaux phénotypes de résistance leur permettant d'échapper aux antibiotiques (Denamur et al., 2012). Les deux principaux phénomènes émergents chez *E. coli* sont les taux de résistance aux quinolones, et la présence de souches résistantes aux β -lactamines (Boyer, 2013).

L'utilisation des β -lactamines a conduit à l'émergence de souches résistantes dans le monde entier. La résistance aux β -lactames, est principalement médiée par l'acquisition de gènes β -lactamase, rendant les souches résistantes aux céphalosporines de troisième génération. Les BLSE sont maintenant les enzymes les plus répandues dans le monde, avec *E. coli* comme hôte microbien majeur.

La plupart des β -lactamases retrouvées chez *E. coli* appartiennent à la classe A d'Ambler, et peuvent être divisées en β -lactamases à spectre étroit (TEM-1, TEM-2, et SHV-1) et aux β -lactamases à spectre étendu (TEM-3, SHV-5, et CTX-M) (Rogers et al., 2011). Les premières BLSE ont été obtenues à partir d'une mutation partielle des pénicillinases TEM et SHV.

Actuellement, la CTX-M la plus répandue est le CTX-M-15, qui a été détectée pour la première fois dans *E. coli* en Inde en 2001. Elle est en train de se propager dans le monde entier, en particulier depuis 2003 (Peirano G et al., 2010). Contrairement aux BLSE de type TEM et SHV, les mécanismes de diffusion de CTX-M15 semblent plus complexes, mettant en jeu plutôt la diffusion de plasmides et/ou d'autres éléments génétiques mobiles (Branger C et al., 2005).

La résistance aux Quinolone concerne plus de 10 % des souches isolées d'infections urinaires communautaires dans plusieurs pays, elle est habituellement provoquée par les diverses mutations chromosomiques qui changent les enzymes de cible, telles que la gyrase et la topoisomérase IV, ou activent les systèmes d'efflux. La résistance plasmidique aux quinolones a été récemment découverte. Le gène responsable de cette résistance est le gène

qnr, sa présence augmente la résistance à l'acide nalidixique et aux fluoroquinolones de quatre à octuple (Jin-Yong et al., 2005). De plus, comme ces gènes sont localisés sur des plasmides, ils peuvent se transmettre horizontalement par conjugaison. Il faut noter que sur ces plasmides peuvent aussi se trouver des gènes qui codent pour des résistances aux bêta-lactames (notamment via la production de bêta-lactamases à spectre étendu), aux macrolides et aux aminosides (Wang et al., 2003). Aujourd'hui, trois groupes de gènes Qnr ont été identifiés chez les Enterobacteriaceae, dont *E. coli* ; qnr A, qnr B et qnr S avec, respectivement, 6, 19 et 3 variantes. Ils appartiennent à la famille de répétition de pentapeptide et aux fragments imitateurs liés à la gyrase. En se fixant directement aux topoisomérase II et IV d'*E. coli*, les protéines Qnr réduisent 50% de l'affinité des topoisomérase à l'ADN. Le mécanisme chromosomique le plus commun de la résistance aux fluoroquinolones est les substitutions d'acide aminé dans les régions d'ADN gyrase (Gyr A) et/ou du topoisomérase IV (ParC), qui sont les molécules principales cibles de fluoroquinolones. Les mutations dans les gènes *gyr* et *par*, représentent un danger potentiel étant donné que cette présence augmente d'un facteur de 10 la probabilité d'apparition de souches à haut niveau de résistance lors de croissance en présence de fluoroquinolones (De Lastours V et al., 2013 ; Batard E et al., 2011).

Le génome des souches d'*E. coli* est très dynamique avec de très nombreux gains et pertes de gènes au cours de l'évolution de la bactérie. En permanence l'acquisition ou le développement de nouveaux mécanismes de résistance, provoquent des changements majeurs dans les fonctions cellulaires et peuvent influencer ainsi la virulence bactérienne. Cette relation entre virulence et résistance a ensuite été retrouvée dans de nombreux endroits du monde sur des collections variées de souches et continue d'être observée dans des études récentes portant sur des centaines de souche (Denamur et al., 2012). Il est incontestable que les bactéries sont soit sensibles, soit résistantes et que la virulence peut être présente ou non chez les deux profils. Le séquençage de génomes complets de bactéries a aussi ouvert des pistes sur les mécanismes moléculaires de ce compromis entre résistance et virulence. De multiples facteurs peuvent servir de médiateur dans la relation entre la virulence et la résistance. Les gènes souvent impliqués dans les deux phénomènes ont le même moyen de transport et de dispersion ; les intégrons, transposons et d'autres éléments génétiques pourraient également faciliter la sélection combinée des gènes de virulence et de résistance. L'augmentation de la résistance peut affecter la virulence de diverses façons,

principalement en fonction de l'espèce bactériennes, l'environnement, et le mécanisme de résistance (Beceiro et al., 2013).

Dans la littérature des résultats contradictoires sont rapportés avec des études suggérant une corrélation positive entre résistance aux antibiotiques et virulence (Yvonne et al., 2005; Pitout et al., 2012) et d'autres rapportant des corrélations négatives (Johnson and al., 2005; Branger,et al., 2005; Horcajada et al., 2005, Da Silva et al., 2012).

C'est dans ce contexte que s'inscrit notre travail et qui consiste à utiliser la cellule spermatique comme modèle d'étude de l'impact de *E.coli* regroupant aussi bien des souches sensibles que résistantes. Ces souches sont isolées du coq reproducteur avec des profils de résistance aux beta-lactamines (CTX-M+ TEM) et la souche sensible coq et des infections uro-génitales chez l'espèce humaine avec des profils de résistance aux beta-lactamines /quinolones /fluoroquinolones (BLSE+ QNR+ FQR /BLSE+ FQR /QNR) et la souche sensible homme, et la souche de référence. L'impact de ces bactéries est testé sur le sperme de deux espèces, l'homme et le bovin.

MATERIELS & METHODES

Dans cette partie nous allons décrire la méthodologie de travail et qui a consisté à étudier les variations de la qualité de mobilité de la semence aussi bien chez l'homme que le bovin après contamination artificielle par des souches d'*E. coli*, résistantes et sensibles aux antibiotiques. .

I. Matériels

I.1. Matériels consommables

Boîtes Pétrie , oses en plastiques , Mac Conkey (isolement et repiquage), gélose nutritive (repiquage et isolement des souches isolées) , tubes à essai stériles , tubes eppendorfs stériles , tubes de conservations , eau distillé , Eau physiologique stérile , Seringue de 5ml , Embouts stériles bleus (1000 μ L) et jaunes (200 μ L) , Micropipettes (1000 μ L, 100 μ L et 10 μ L).

I.2. Matériels non consommables

Plaque chauffante et agitatrice, hotte bactériologique, Vortex, Spectrophotomètre.

I.3. Réactifs chimiques

Les réactifs utilisés dans la galerie Api 20 E sont :

- Réactif de kovacs (mettre en évidence la production de l'indole),
- NRI et NRII (révélation de la nitrate réductase),
- VPI et VP II (révélation de la formation d'acétoïne),
- L'huile de paraffine (pour l'anaérobiose).

I.4. Matériel biologique

- **Spermatozoïdes humains**

Les spermatozoïdes utilisés dans cette expérience sont obtenus à partir de personnes désirant effectuer des spermogrammes. La semence est collectée après trois jours d'abstinence. Les échantillons utilisés proviennent d'un laboratoire d'analyses médicales dans la ville de Bejaia. Seuls les échantillons de bonne qualité sont inclus dans le présent travail.

- **Spermatozoïdes bovins**

Pour l'ensemble des expériences effectuées sur le bovin, la semence épидидymaire a été recueillie à partir de testicules de taureau achetés dans une boucherie de la ville de Bejaia. Les testicules sont utilisés dans les 3 heures qui suivent l'abattage pour garantir la survie des spermatozoïdes.

I.5. Matériel d'analyse

L'analyse des paramètres spermatiques a été réalisée par un analyseur informatique CASA (SCA, Barcelone) (**Fig 1**), il a pour objet l'analyse informatisée de la trajectoire des spermatozoïdes *in vitro*. Il est proposé dans le cadre de l'exploration d'une infertilité masculine avant et au cours d'une procédure d'assistance médicale à la procréation (AMP). C'est un système qui fournit des informations précises et exactes sur différentes caractéristiques de mouvement des spermatozoïdes.

Le système CASA est utilisé pour générer un certains nombres de paramètres qui sont les suivants :

- Le pourcentage de spermatozoïdes mobiles : c'est l'ensemble des spermatozoïdes qui bougent indépendamment de leur qualité de mouvement et ceci par rapport à la population totale.
- Les différentes vitesses de progression :
 - VCL: c'est une vitesse qui considère la distance totale parcourue par le spermatozoïde pour un temps donné.
 - VSL: vitesse qui prend en considération le point de départ et celui d'arrivée du spermatozoïde indépendamment de son trajet.
 - VAP : c'est l'équivalent de la VCL après lissage de son trajet.
 - ALH: c'est la distance balayée par la tête du spermatozoïde durant son déplacement.
- Le pourcentage de spermatozoïdes statiques : c'est l'ensemble des spermatozoïdes qui ne bougent pas pendant l'analyse.
- Le pourcentage de spermatozoïdes rapides : c'est le pourcentage de spermatozoïdes ayant une VAP supérieure à 50 $\mu\text{m}/\text{seconde}$.

- Le pourcentage de spermatozoïdes progressifs : c'est le pourcentage de spermatozoïdes dont la VAP est supérieure à 50 $\mu\text{m}/\text{seconde}$ et une linéarité supérieure à 75 %.

Dans notre cas nous avons retenu deux paramètres, le pourcentage de mobilité et la VSL qui sont révélateurs de la qualité du sperme.



Fig 1 : image de l'analyseur informatique de sperme (CASA).

II . Méthodes

II .1. Collecte de la semence de bovin

Bien que nous avons choisi le sperme humain pour notre principale expérimentation, le sperme bovin a été aussi utilisé afin de comparer si les mêmes bactéries entraînent les mêmes effets indépendamment de l'espèce. Les testicules de taureaux sont récupérés tôt le matin puis transporté au laboratoire à température ambiante, la récolte ne se fait que sur des taureaux sains (**Fig 2**).



Fig 2 : Image d'un testicule bovin.

Premièrement, les tissus qui enveloppent le testicule et l'épididyme ont été enlevés avec une lame tranchante, l'épididyme et le canal déférent ont été ensuite complètement isolés du testicule puis rincés avec l'eau et séchés avec du papier absorbant (**Fig 3**).



Fig 3 : Image de l'épididyme juste après sa dissection et sa séparation du testicule.

Les tissus en excès et les tissus conjonctifs ont été éliminés, puis l'épididyme a été isolé des vaisseaux sanguins pour éviter toute contamination de la semence avec le sang.

En fin la semence est récoltée avec la méthode rétrograde (**Martins FC et al ., 2007**). L'aiguille d'une seringue remplie d'air est introduite dans la lumière du canal déférent, un clamp est placé juste à la fin de la queue et au début du corps épидидymaire (**Fig 4**).



Fig 4 : Récolte de la semence par la méthode rétrograde.

Divers incisions sur la queue de l'épididyme ont été réalisées puis, en appuyant sur cette région manuellement le sperme a été libérés et recueilli dans un tube eppendorf stérile (**Fig 5**).



Fig 5 : recueil de la semence dans un tube eppendorf.

II. 2. Infection du sperme

II. 2.1.Souches bactériennes

Durant cette étude, nous avons travaillé sur des souches d'*E. Coli* sensibles et résistantes avec des différents profils de résistance. Certaines sont isolées du coq reproducteur et d'autres de contaminations uro-génitales chez l'humain.

- souche d'*E. coli* sensible a tous les antibiotiques isolés du coq (S Q).
- souche d'*E. coli* sensible à tous les antibiotiques isolés d'infections urinaires chez l'homme (adulte) (S H), récupérée dans un laboratoire d'analyse.
- souche d'*E. coli* ATCC 25922 de référence sensible a tous les antibiotiques.
- Deux souches d'*E. coli* isolées du coq résistantes aux β –lactamines à spectre élargi par la production de CTX-M et TEM.
- souche d'*E. coli* résistante aux β –lactamines à spectre élargi et aux quinolones par la production d'une CTX –M 15, TEM-1et des mutations gyr A / par C, isolée d'infection urinaire chez la femme (adulte).
- souche d'*E. coli* résistante aux quinolones par qnr S, isolée d'infections urinaires chez la femme (adulte).
- souche d'*E. coli* résistante aux β –lactamines à spectre élargi par la production de CTX-M 15 et aux quinolones par le gène qnr B et mutation gyr A / par C isolée d'infection urinaire chez l'homme (adulte).

II.2.2.Identification des souches

La totalité des souches ont été identifiées par la galerie API 20E.

➤ Principe

La galerie API 20 E comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés. Les microtubes sont inoculés avec une suspension bactérienne qui reconstitue les tests, les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs. La lecture de ces réactions se fait à l'aide du Tableau de Lecture et l'identification obtenue à l'aide du Catalogue Analytique ou d'un logiciel d'identification.

➤ Préparation de l'inoculum

Mettre une à deux colonies de culture de 18 à 24 h, dans 5 ml d'eau physiologique stérile.

➤ Inoculation de la galerie

Introduire la suspension bactérienne dans chaque tube à l'aide d'une micropipette, la pointe appuyée à l'intérieur et sur le côté pour éviter la formation de bulles.

Remplir de suspension le tube et la cupule des tests encadrés et recouvrir d'huile de paraffine les tests soulignés.

➤ Lecture de la galerie

Après 24h d'incubation à 37°C, la lecture de la galerie est réalisée pour les tests spontanés et on rajoute les réactifs pour les tests restants avant la lecture.

La lecture de la galerie a été réalisée à l'aide d'un programme d'identification microbienne (bioeluard), c'est un programme de transcription "en ligne" du calcul de probabilité à partir d'une base de données en pourcentage de positivité et du profil phénotypique obtenu dans une galerie répondant aux caractères de la galerie.

II.2.3.Préparation des échantillons de sperme infecté

➤ Bovin

Après la préparation des suspensions bactériennes équivalentes au 0.5 Mac Farland, pour les huit bactéries, 1mL de chaque suspension est ajouté dans des eppendorfs stériles, un eppendorf contenant l'eau physiologique stérile seule est utilisé comme témoin, les neuf

tubes eppendorfs sont ensuite aliquotés par 10 μl de la semence collectée, de telles sortes à obtenir un volume final de 1 ml. L'expérience a été répétée trois fois.

➤ Humain

Préparation pour chaque bactérie d'une suspension bactérienne équivalente au 0.5 Mac Farland. 100 μl de chaque suspension sont ajoutés dans des eppendorfs stériles, et un témoin qui correspond à l'eau physiologique stérile seule, les neufs tubes eppendorfs sont ensuite aliquotés par 100 μl de la semence collectée. L'expérience a été répétée deux fois.

II.2.4. Analyse aidée par ordinateur de la semence(CASA)

La motilité est appréciée par l'observation visuelle sur un écran d'un ordinateur relié au microscope. Une goutte de 10 μl est déposée directement sur la chambre de MAKLER, au grossissement X10, la motilité est évaluée comme décrit par **Yaniz et al. (2008)**. Durant cette expérience, les différents paramètres spermatiques suite à l'effet des bactéries ont été mesurés chaque heure de T_0 à T_4 chez l'homme et de T_0 à T_5 chez le bovin.



Figure 6 : Image de lame de MAKLER.

II.2.6 Analyse statistique

Dans le présent travail nous avons utilisé le logiciel STATVIEW version 4.5 pour le traitement des données brutes, des analyses de variances ou de tests au cours du temps sont utilisées pour comparer les différences observées. Les résultats des tests effectués dans cette étude sont exprimés en moyenne \pm écarts types.

RESULTATS

I. Identification des souches

L'identification obtenue par la galerie Api 20 E, a confirmée que les souches appartenaient toutes à l'espèce *Escherichia coli*, les résultats des caractères biochimiques obtenus sont représentés en annexes.

II. Impacte des bactéries sur la semence

Au cour de notre expérience, nous avons exposé *in vitro* les spermatozoïdes humains et bovins à des souches d'*E. coli* sensibles et résistantes. L'objectif recherché est de savoir si la virulence, est variable en fonction du statut de résistance et s'il est constant sur la semence de deux espèces, l'humain et le bovin.

II.1. L'évolution de la motilité spermatique

➤ Sperme infecté par les bactéries isolées chez l'homme

Les **Fig 7** et **8** représentent respectivement l'évolution du pourcentage de la motilité (MS, %) dans le sperme humain (**Fig7**) et le sperme bovin (**Fig 8**), à T_0 on remarque déjà une différence entre les pourcentages de mobilité des spermatozoïdes chez les deux espèces, humain et bovin. Cela démontre que la présence des bactéries dans le sperme affecte la mobilité des spermatozoïdes rapidement après contact.

En comparant l'allure générale des deux graphes on constate que les bactéries agissent différemment dans le sperme humain et le sperme bovin, dans le sperme humain le témoin a montré le plus grand pourcentage de motilité 56,34%, la souche sensible ainsi que la souche de référence ATCC semblent affecté le plus la mobilité que les souches résistantes aux deux antibiotiques (beta-lactamines à spectre élargi et fluoroquinolones). Cependant, l'échantillon ayant la bactérie résistante uniquement aux quinolones présente le plus faible pourcentage de motilité avec 42,37%. Au court du temps, l'évolution de la mobilité reste instable à l'exception des deux échantillons contenant les souches résistantes au deux antibiotiques (beta-lactamines à spectre élargi et quinolones) qui ont connus une baisse régulière.

En revanche les résultats obtenus avec le sperme humain ne corrèlent pas avec ceux du sperme bovin, dans ce dernier (**Fig 8**) à T_0 la meilleure motilité a été observée dans l'échantillon contenant la souche de référence et que toutes les souches résistantes avaient

une meilleure motilité que la souche sensible. Dans l'intervalle du temps entre T_0 et T_1 la motilité a marqué une importante chute dans tous les échantillons, au fils du temps l'évolution de la motilité reste rapprochée et similaire dans tous les échantillons à l'exception de l'aliquote contenant la souche de référence.

D'après les deux graphes nous pouvons donc suggérer que l'effet sur le sperme humain et bovin de bactéries isolées chez l'homme est indépendant du statut de résistance de la bactérie. Ceci est justement confirmé sur les **Fig 9** et **10**, en regroupant toutes les bactéries en fonction de leurs statut, résistant sensible, les courbes de motilité se chevauchent.

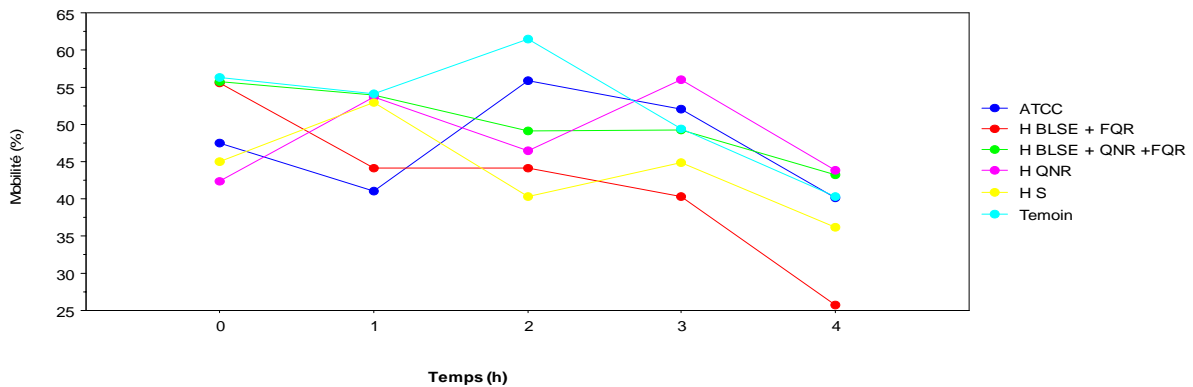


Fig 7: Courbes représentant l'évolution de la motilité du sperme humain en présence de bactéries isolées chez l'homme.

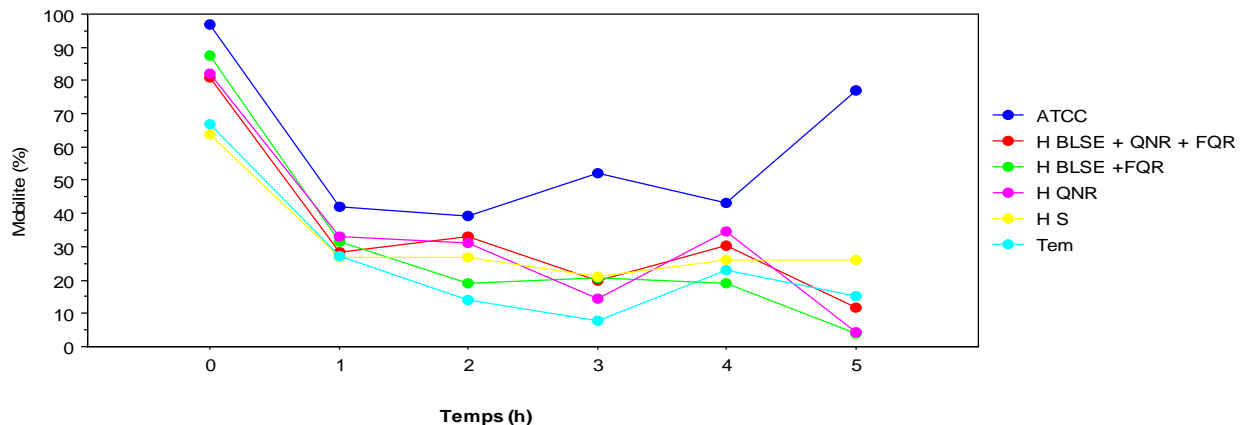


Fig 8 : Courbes représentant l'évolution de la motilité du sperme bovin en présence de bactéries isolées chez l'homme.

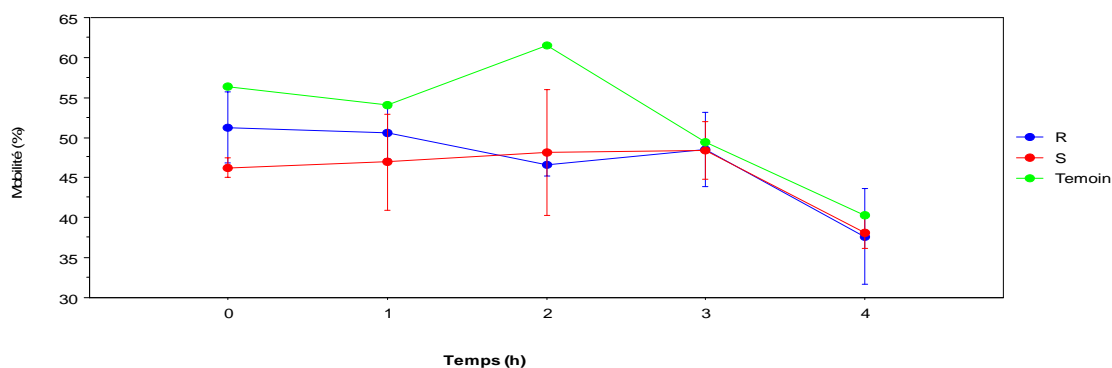


Fig 9: Courbes représentant l'évolution de la mobilité du sperme humain en fonction de la sensibilité et la résistance des bactéries isolées chez l'homme.

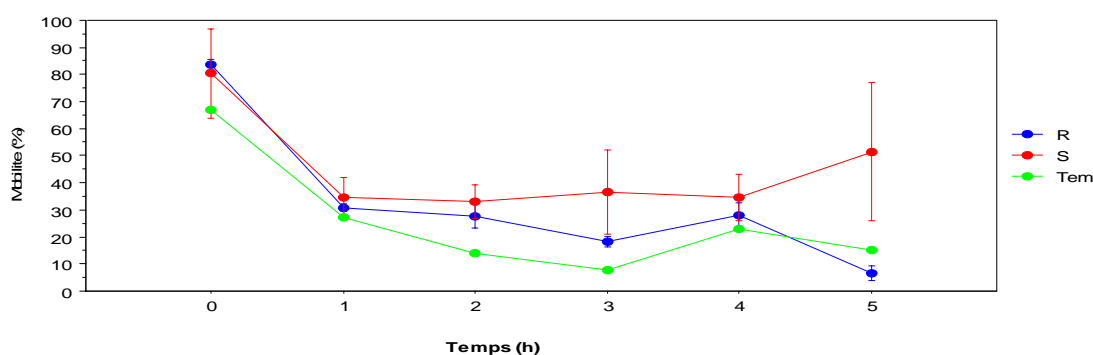


Fig 10: Courbes représentant l'évolution de la mobilité du sperme bovin en fonction de la sensibilité et la résistance des bactéries isolées chez l'homme.

➤ Sperme infecté par les bactéries isolées du coq

Les résultats de l'analyse de la mobilité du sperme humain et bovin en présence de bactéries isolées de l'espèce aviaire (coq) sont représentés sur les **Fig 11** et **12**.

Les résultats de l'évolution au court du temps dans chaque échantillon sont différents dans les deux spermes (humain et bovin), cela est clairement observé dans les courbes obtenues avec les souches isolées chez l'homme (**Fig 7 et 8**), on s'appuyant sur nos résultats on constate alors que l'effet des bactéries sur la motilité spermatique dépend de l'espèce en cause.

Sur la **Fig 11** l'analyse à T_0 montre des différences entre les aliquotes, la souche(1) productrice de BLSE montre un haut pourcentage de mobilité, il vient juste après celui de la souche de référence. Cependant la souche (2) productrice de BLSE a montré la plus faible

mobilité, entre T_0 et T_4 l'évolution de tous les échantillons a connue des hausses et des baisses irrégulières. Dans le sperme bovin (**Fig 12**) des distinctions entre les différents aliquotes ont été observés mais moins importante que celles observées sur le sperme humain (**Fig 11**).

Nous pouvons retenir, notamment avec la **Fig 11**, qu'un même profil de résistance, en l'occurrence CTX-M+TEM, entraine des impacts différents, démontrant ainsi que non seulement la virulence n'est pas liée au statut de résistance aux antibiotiques (**Fig 13 et 14**), mais aussi qu'au sein d'un même profil, il reste dépendant de la bactérie.

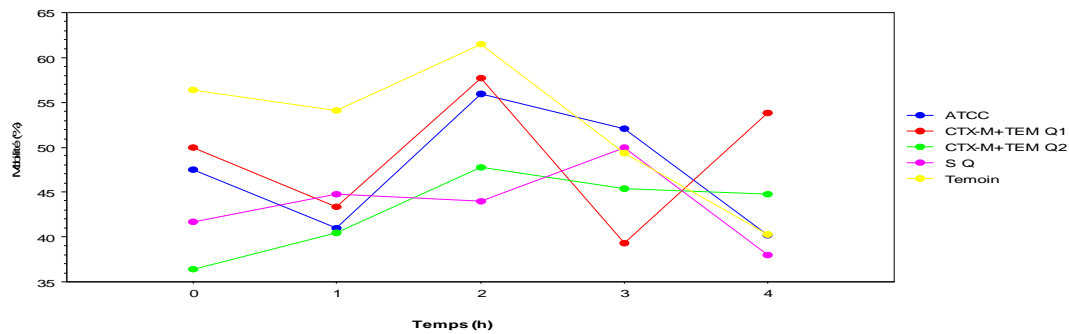


Fig 11 : Courbes représentant l'évolution de la mobilité du sperme humain en présence de bactéries isolées chez le coq.

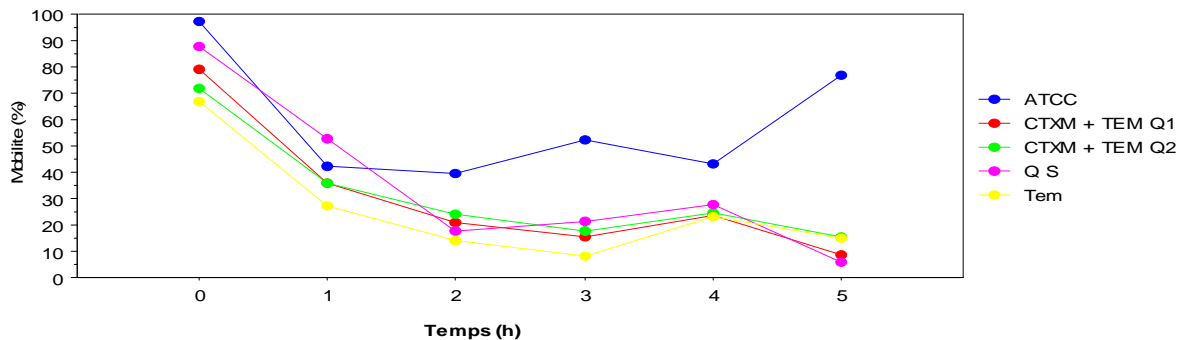


Fig 12 : Courbes représentant l'évolution de la mobilité du sperme bovin en présence de bactéries isolées chez le coq.

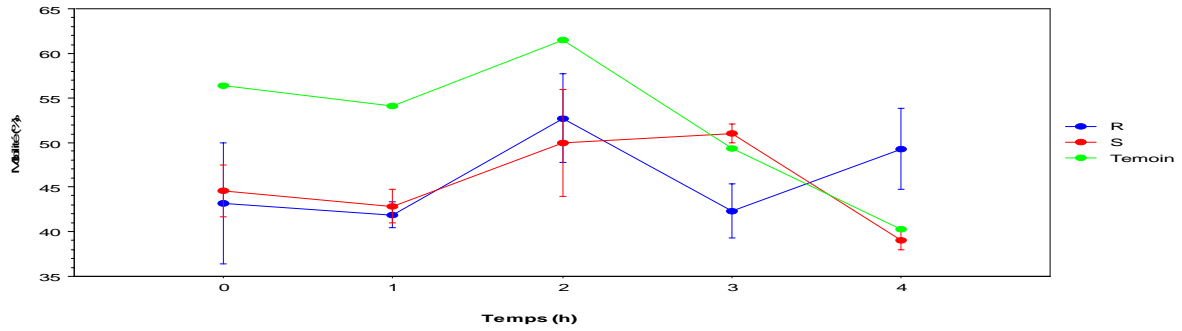


Fig 13 : Courbes représentant l'évolution de la motilité du sperme humain en fonction de la sensibilité et la résistance des bactéries isolées chez le coq.

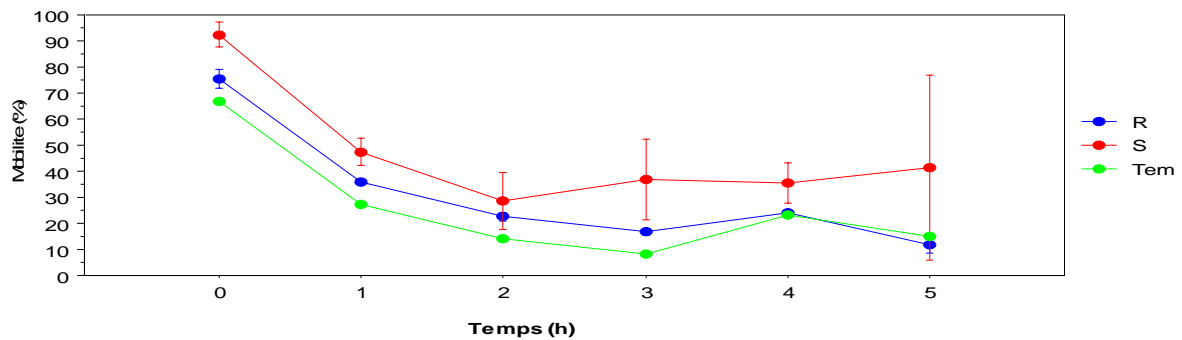


Fig 14 : Courbes représentant l'évolution de la motilité du sperme bovin en fonction de la sensibilité et la résistance des bactéries isolées chez le coq.

II.2. Vitesse de progression linéaire

Les histogrammes si dessous représentent l'évolution de la VSL dans les spermes humain et bovin en présence de bactéries isolées chez l'homme et le coq.

Les résultats de l'évolution de la VSL dans le sperme humain infecté par les bactéries isolées de l'homme (**Fig 15**) sont fortement différents des résultats enregistrés sur le sperme bovin (**Fig 16**). Dans les deux spermes on constate que la présence de bactéries isolées chez l'homme influence la VSL des spermatozoïdes et que cet influence ne dépend pas de la sensibilité ou du profil de résistance, on constate aussi qu'en infectant les spermes bovin et humain par la même bactérie, l'effet sur la VSL diffère en fonction de l'espèce. Ces mêmes constatations ont également été observées chez les bactéries isolées du coq (**Fig 17 et 18**).

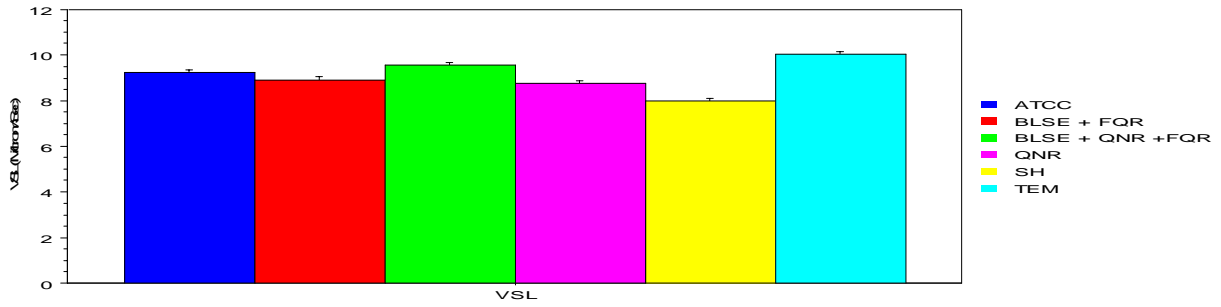


Fig 15 : Histogramme représentant l'évolution la vitesse de progression linéaire du sperme humain en présence de bactéries isolées chez l'homme.

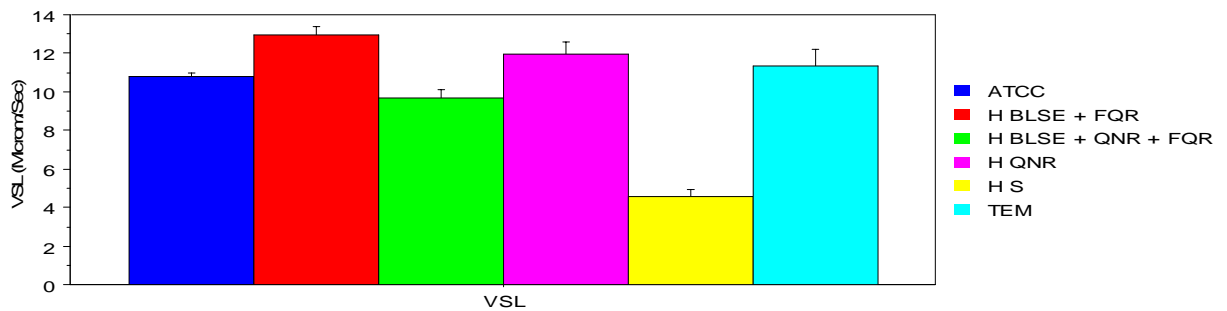


Fig 16 : Histogramme représentant l'évolution la vitesse de progression linéaire du sperme bovin en présence de bactéries isolées chez l'homme.

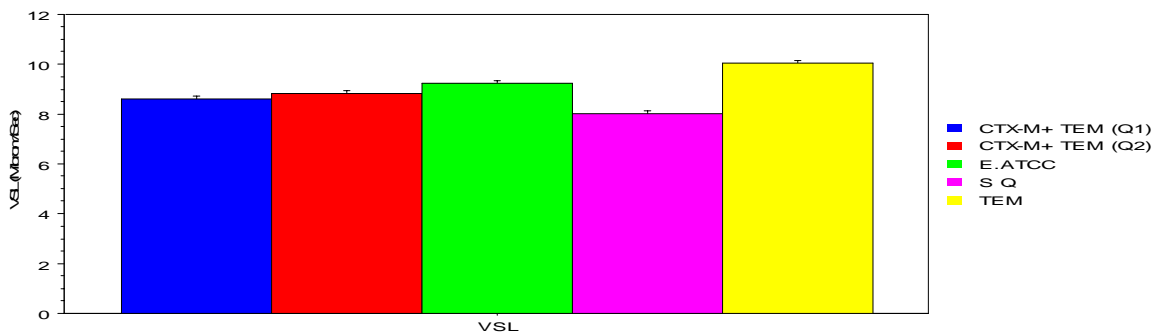


Fig 17: Histogramme représentant l'évolution la vitesse de progression linéaire du sperme humain en présence de bactéries isolées chez le coq

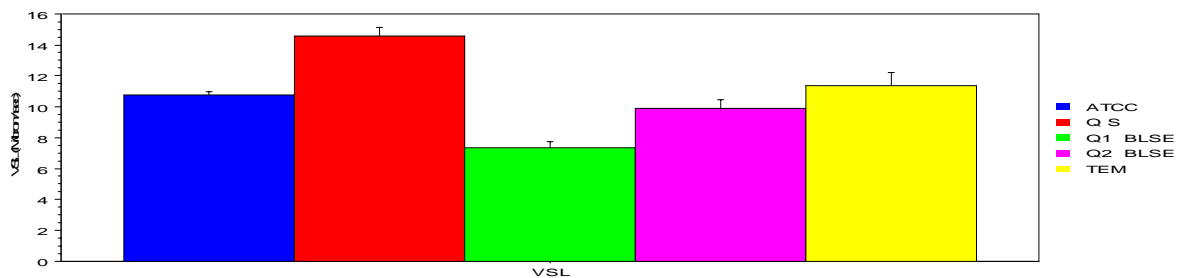


Fig 18 : Histogramme représentant l'évolution la vitesse de progression linéaire du sperme bovin en présence de bactéries isolées chez le coq.

DISCUSSION & CONCLUSION

Les effets de certaines espèces de bactéries sur le sperme, n'ont pas été analysés en profondeur dans la plupart des études portant sur la reproduction humaine. Peu d'informations sont disponibles sur l'influence directe des bactéries sur le sperme (Gonzalez –Marina C et al., 2011).

E. coli représente un énorme fardeau pour la santé publique dans les maladies humaines, car elle est la cause la plus commune des infections communautaires et nosocomiales de l'appareil urinaire (IU). Le sperme humain est susceptible d'être infecté par cette bactérie en passant vers l'appareil génital male, d'où la problématique bactéries-spermatozoïdes et où *E. coli* est réputé comme facteur contribuant à la baisse de la fertilité masculine. La relation entre *E. coli* résistante /sensible et virulence a été à l'origine de multiples controverses.ref

Dans notre étude nous avons contaminé à la fois le sperme humain et bovin par des souches d'*E. coli* sensibles, et des souches résistantes d'origine humaine et animale (coq). Ceci afin de comprendre la probabilité d'existence d'une relation entre ces mécanismes de résistances et la virulence. Nous avons opté pour un modèle cellulaire qui est le spermatozoïde, tout-à-fait indiqué pour explorer l'impacte bactérien. Nous avons précisément utilisé un analyseur informatique pour quantifier d'une manière objective l'impact sur la mobilité spermatique, paramètre reconnu comme réel indicateur de l'intégrité cellulaire.

La relation résistance/virulence reste un sujet d'actualité qui a suscité la curiosité de plusieurs scientifiques durant ces dernières années.

Sanocka-Maciejewska et al (2005) ont rapporté que les bactéries les plus fréquemment isolées des infections génito-urinaires des hommes n'ont aucun effet sur la qualité du sperme chez les hommes normozoospermic, tandis que d'autre ont rapporté que la simple présence de bactéries pourrait altérer la qualité du sperme. (Moretti et al., 2009), ceci est concordé avec nos résultats qui révèlent une différenciation significative de la motilité entre les échantillons dès les premiers contacts.

Plusieurs articles documentent l'association possible entre résistance et virulence dans *E. coli*. Un exemple très récent est fourni par le plasmide hybridé par conjugaison entièrement séquencé d'*E. coli* entérotoxigène (ETEC), possédant des gènes pour des entérotoxines et un transposon composite portant le gène de résistance à la tétracycline (Fekete et al., 2012).

Durant notre travail nous nous sommes intéressées à des souches résistantes aux beta-lactamines, aux quinolones, et à des souches qui résistent à la fois aux beta-lactamines et aux quinolones, plusieurs auteurs ont rapporté que la résistance au beta-lactamines ou aux quinolones pourrait influencer sur la virulence (Horcajada et al., 2005).

Malgré des tentatives répétées d'explication de la biologie de la liaison entre la résistance aux quinolones/fluoroquinolones et la virulence, les résultats de la littérature restent contradictoires à cause de la complexité du sujet. Denamur et al (2012) ont étudié la relation entre la résistance aux quinolones et la virulence, et ils ont rapporté que la résistance aux quinolones a la capacité d'induire la perte partielle ou totale des facteurs de virulences chez les souches pathogènes d'*E. coli*. D'autres études suggèrent une relation inverse entre l'expression de la virulence et la résistance aux quinolones (Vila et al., 2002).

En analysant l'impact sur la mobilité et la vitesse progressive des spermatozoïdes nous avons constaté que dans certain échantillons les bactéries résistantes aux quinolones affectent les paramètres spermatiques plus que les bactéries sensibles et dans d'autres cas c'est le contraire qui est observé.

Comme pour la résistance aux quinolones, des études ont été menées sur la résistance aux beta-lactamines et la virulence. Denamur et al (2012) ont constatés que les souches productrices de beta-lactamases à spectre élargi avait moins de virulence que les souches sensibles, mais Da silva et al (2012) ont démontré que les souches d'*E. coli* productrices de BLSE type CTX-M-15 étaient hautement virulentes, et pouvaient déclencher plusieurs pathologies chez plusieurs espèces. Une autre, étude a montré que les souches productrices de BLSE (CTX-M-15) dans EPEC humaine étaient caractérisées principalement par une virulence élevée dans des modèles murins (Clermont et al., 2008).

Dans notre étude les résultats de l'infection du sperme par les souches sensibles aux beta-lactamines à spectre élargi et résistantes isolées chez l'homme et le coq ont montré que l'influence de ces bactéries sur les paramètres spermatiques est totalement indépendant de la sensibilité ou de leurs profil de résistance et ceci même dans les isolats qui avait une multi résistance (BLSE, quinolones, fluoroquinolones). Aucune relation n'a été relevée entre la sensibilité, la résistance et la virulence aussi bien sur sperme humain que bovin. De plus, nous avons constaté que la contamination du sperme par deux souches ayant le même phénotype de résistance avait un effet différent sur le sperme. Ceci est probablement un signe que la virulence reste indépendante de la résistance aux antibiotiques, et nous laisse supposer

que la virulence peut être directement liée à la bactérie elle-même avec ses propriétés génétiques. Ceci pourrait avoir comme conséquence dans l'exploration de l'infertilité masculine, liée aux infections bactériennes, de considérer avec la même gravité les bactéries sensibles et résistantes.

Cependant, des recherches utilisant les techniques de biologie moléculaire doivent encore explorer la relation résistance-virulence à des niveaux génétiques, et identifier simultanément les mécanismes de régulation de l'expression de ces deux composantes, mais il serait aussi intéressant d'inclure dans les études à venir tous les mécanismes de résistances existants.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

A

AL-Husseiny K R.(2011). Genitourinary tract infections relationship with male infertility: A bacteriological study. Technical Institute.

B

Batard E, Montassier E, Ballereau F et Potel G. (2011).De la consommation d'antibiotiques aux résistance bactérienne :l'exemple de la résistance d'*Escherichia coli* aux quinolones. Médecine thérapeutique. Volume 17, Numéro 4,294-301 .

Beceiro A, Tomás M and Bou G.(2013). Antimicrobial resistance and virulence: a successful or deleterious association in the bacterial world?.Clin Microbiol Rev.(2013) Apr;26(2):185-230. doi: 10.1128/CMR.00059-12.

Boyer T. (2013).Lutte contre les bactéries multiristantes en ville : état des lieux moyens mis en œuvre après une hospitalisation. Thés pour le diplôme d'état de docteur en médecine.

Branger C, Zamfir O, Geoffroy S, Laurans G, Arlet G, ThienH- V, Gouriou S, Picard B, and Denamur E. (2005).Genetic background of. *Escherichia coli* and extended spectrum lactamase type. Emerging Infectious Diseases. Vol. 11, No. 1.

C

Cabannes CR. (2008). Comparison of evaluation of the quality of semen in bovine, canine and human methods. PhD vet. University Paul Sabatier of Toulouse.107p.

Clermont O, Lavollay M, Vimont S, Deschamps C, Forestier C, Branger C, et al. (2008). The CTX-M-15-producing *Escherichia coli* diffusing clone belongs to a highly virulent B2 phylogenetic subgroup. *J. Antimicrob. Chemother.* 61 1024–1028 10.1093/jac/dkn084.

Cohen-Bacrie P et Belloc S. (2009). Influence des facteurs infectieux sur les marqueurs du sperme. JTA,infertilité et spermologie.260 :556.

D

Références bibliographiques

Da Silva GJ, Mendonça N.(2012). Association between antimicrobial resistance and virulence in *Escherichia coli*. Landes Bioscience. 10.4161.

De Lastouirs V et Fantin B. (2013).La juste prescription des quinolones.

Denamur E and Picard B. (2012). Virulence and resistance: two antagonistic properties in *Escherichia coli*?. Paris. Reanimation .21:249-251.

Descamps F. (2004). Sperme et sexualité. Sexologie clinique. 59p.

Diemer T, Weidner W., Michelmann H W., Schiefer H G, Rován E and Mayer F. (1996).Influence of *Escherichia coli* on motility parameters of human spermatozoa *in vitro*. International Journal of Andrology, vol. 19, no. 5, pp. 271–277 .

J

Fekete P. Z, Brzuszkiewicz E, Blum-Oehler G, Olasz F, Szabó M, Gottschalk G, et al. (2012).DNA sequence analysis of the composite plasmid pTC conferring virulence and antimicrobial resistance for porcine enterotoxigenic *Escherichia coli*. Int. J. Med. Microbiol. 302 4–9 .

J

Gonzalez-Marin C, Roy R, Lopez-Fernandez C, Diez B, Carabaño M J, Fernandez J L, Kjelland M E, Moreno J F and Gosálvez J.(2011). Bacteria in bovine semen can increase sperm DNA fragmentation rates: A kinetic experimental approach. Animal Reproduction Science 123 (2011) 139–148.

H

Haines MD, Parker HM, Daniel CD and Kiess AS. (2013). Impact of 6 different intestinal bacteria on broiler breeder sperm motility *in vitro*. Poultry Science Department, Mississippi State University, Mississippi State 39762.

Hamamah S and Barthelemy C. (1997). Spermogramme et tests de fécondance : intérêt et limites. Unité de biologie de la reproduction, département de gy-Obs.CHU Bretonneau, 37044 Tours codex.

Références bibliographiques

Horcajada JP, Soto S, Gajewski A, et al (2005) .Quinolone- resistant uropathogenic *Escherichia coli* strains from phylogene- tic group B2 have fewer virulence factors than their susceptible counterparts.J Clin Microbiol.43:29 62-4.

Huwe P, Diemer T, Ludwig M, Liu J, Schiefer HG, and Weidner W.(1998). Influence of different uropathogenic microorganisms on human sperm motility parameters in an in vitro experiment. Andrologia. 1998;30 Suppl 1:55-9.

J

Jing-Yong J, YOON H J, KIM E S, Yoola L, Sang-Ho C, Kim N J, Woo J H and Kim Y S.(2005). Detection of qnr in clinical isolates of *Escherichia coli* from Korea. Antimicrob Agents Chemother. , vol. 49, n°6, pp. 2522-2524.

Johann D. D. Pitout.(2012). Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*: A Combination of Virulence with Antibiotic Resistance. Front Microbiol. 10.3389.

Johnson James R, Kuskowski Michael A, O'Bryan Timothy T, Raul C, and Raul R .(2005). Virulence Genotype and Phylogenetic Origin in Relation to Antibiotic Resistance Profile among *Escherichia coli* Urine Sample Isolates from Israeli Women with Acute Uncomplicated Cystitis. Antimicrob Agents Chemother. 10.1128.

K

Khalili MB, Sharifi-Yazdi MK.(2001). The Effect of Bacterial Infection on the Quality of Human's Spermatozoa. Iranian J. Publ. Health, Vol. 30, Nos. 3-4, PP. 119-122 .

Keck C, Gerber-Schafer C, Clad A, Wilhelm C and Breckworldt M. (1998) .Seminal tract infections: impact on male fertility and treatment options. Human reproduction update 1998, vol. 4, No. 6 pp. 891-903.

M

Martins FC , Rumpf R , Pereira DC and Dode MN . (2007). Cryopreservation of epididymal bovine spermatozoa from dead animals and its uses in vitro embryo production. Animal Reproduction Science.Volume 101,Pages 326–33.

Références bibliographiques

Moretti E, Capitani S, Figura N, Pammolli A, Maria Grazia F, Giannerini V, and Collodel .(2009). The presence of species of bacteria in the semen and sperm quality. J Reprod Assist Genet. 26 (1): 47-56.



Paulson JD and Polakoski K L. (1977) .Isolation of a spermatozoal immobilization factor from *Escherichia coli* filtrates. Fertility and Sterility, vol. 28, no. 2, pp. 182–185.

Peirano G , Richardson D, Nigrin J, McGeer A, Loo V , Teye B , Alfa M , Pienaar C , Kibsey P and Pitout J .(2010). High prevalence of ST131 isolates producing CTX-M-15 ft CTX-M-14 among extended-spectrum- β -lactamase *Escherichia coli* isolates from Canada .Antimicrobial agents and Chemotherapy.13327-30.

Prabha V, Sandhu R, Kaur S, Kaur K, Sarwal A, S.Mavuduru R and Singh SK.(2010).Mechanism of Sperm Immobilization by *Escherichia coli*. Advances in Urology, Article ID 240268, pages 6.

Prabha V, Thakur N, Kaur S, Kaur N, Singh A and Kala S. (2009). Agglutination of Human Spermatozoa Due to Human Semen Culture Bacterial Isolates Bearing Sperm Ligand. American Journal of Biomedical Sciences.

Putin C, Bianchetti S Lornage J. (2010). Incidence de l'infection du tractus génital et des glandes annexes sur la fertilité masculine. médecine de la reproduction, gynécologie et endocrinologie. Volume 12, Numéro 3, 233-41.



Rogers BA , Sidjabat HE and Paterson DL.(2011). *Escherichia coli* O25b-ST131: a pandemic, multiresistant, community-associated strain. J Antimicrob Chemother . 10.1093.



Sanocka-Maciejewska D, Ciupińska M and M. Kurpisz .(2005). Infection bactérienne et la qualité du sperme. J Reprod Immunol; 67:51-6.

Références bibliographiques

Sepulveda L, Bussalleu E, Yeste M, Torner E and Bonet S. (2013) . How do different concentrations of *Clostridium perfringens* affect the quality of extended boar spermatozoa?. *Animal Reproduction Science* 140 (2013) 83– 91.



Vandaele P.(2013). Nodule testiculaire et échographie de contraste.These de doctorat. Université du droit et de la santé- Lille 2, Faculté de Médecine HENRI WAREMBOURG.50p.

Vila J, Simon K , Ruiz J , Horcajada JP , Velasco M , M Barranco , Moreno A , Mensa J.(2002). Uropathogène *Escherichia* résistants aux quinolones sont coli moins virulent?. *J Infect Dis.* 186 (7) :1039-42.



Wang M, Tran JH, Jacoby GA, Zhang Y, Wang F and Hooper DC.(2003). Plasmid-mediated quinolone resistance in clinical isolates of *Escherichia coli* from Shanghai, China. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003 Jul; 47(7):2242-8.



Yanis J L, Santolaria P, Marco-Aguado M A and Lopez-Gatius F. (2008).Use of image analysis to assess the plasma membrane integrity of ram spermatozoa in different diluents. *Theriogenology* 70:192-198.

Yvonne M B, ECKEHARD B, Lisa L, Nicholas L, Heather N, Mark R. (2005). Slowing down a pine invasion despite uncertainty in demography and dispersal. *Journal of Applied Ecology.* Volume 42, Issue 6, pages 1020–1030.

ANNEXES

Tableau I: représentant les caractéristiques des souches identifiées par la galerie API 20 E.

Souches/tests	E.ATCC	KB337	LB443	MB	M490	S01	S13	S21
ONPG	+	+	+	+	+	+	+	+
ADH	+	+	+	+	+	+	+	+
LDC	+	+	+	+	+	+	+	+
ODC	+	+	-	+	+	-	+	-
CIT	-	-	-	-	-	-	-	-
H ₂ S	-	-	-	-	-	-	-	-
UREE	-	+	-	-	-	-	-	-
TDA	-	-	-	-	-	-	-	-
IND	+	+	+	+	+	+	+	+
VP	+	-	-	+	+	-	-	-
GEL	-	-	-	-	-	-	-	-
GLU	+	+	+	+	+	+	+	+
MAN	+	+	+	+	+	+	+	-
INO	-	-	-	-	-	-	-	-
SOR	+	+	+	+	+	+	+	+
RHA	+	+	+	+	+	+	+	+
SAC	+	-	-	+	-	+	+	-
MEL	+	+	+	+	+	+	+	+
AMY	-	-	-	-	-	-	-	-
ARA	+	+	+	+	+	+	+	+

Tableau II: composition du milieu Mac Conkey Agar W/CV, NACL and 0.5 Bile Salts (HIMEDIA)

Peptics digest of animal tissue	20,00
lactose	10,00
Sodium chloride	5,00
Bile salts	1,50
Neutral red	0,05
Crystal violet	0,001
Agar	15,00
Final pH (at 25°C)	7,2 ±0,2

Résumé

Le présent travail s'est fixé comme objectif d'évaluer l'effet de la contamination artificielle du sperme humain et bovin par des *E. coli* résistantes et sensibles aux antibiotiques. Ces souches sont isolées d'infections uro-génitales humaines et du coq reproducteur. Les souches ont été identifiées par la galerie API20 E. le sperme est évalué par un analyseur informatique pour générer deux paramètres de qualité des spermatozoïdes, le pourcentage de mobilité totale et les vitesses de progression (VSL). Les résultats obtenus montrent que les bactéries aussi bien résistantes que sensibles influencent variablement les paramètres spermatiques, cette influence reste néanmoins non liée au statut de résistance des souches. Ceci probablement signifie que la virulence à travers laquelle les bactéries induisent l'effet délétère sur les spermatozoïdes est indépendante de la résistance aux antibiotiques.

Mots clés : contamination bactérienne, *E. coli*, sperme humain, motilité spermatique, résistance, virulence.

Abstract

The objective of the present work is to evaluate the effect of artificial contamination of human and bovine semen by antibiotic resistant and susceptible *E. coli* strain. These strains were isolated from human urogenital infections and breeding roosters. The strains were identified by the API20 E gallery. Semen is evaluated by a computer analyzer to generate two sperm quality parameters, the percentage of total mobility and progressive velocity (VSL) of the gametes. The results showed that resistant and sensitive bacteria affect variably sperm parameters. However, these effects are not related to resistance statute of the strains. This probably means that the virulence of the bacteria, through which induce deleterious effect on sperm, is independent of antibiotic resistance.

Keywords: bacterial contamination, *E. coli*, human sperm motility sperm, resistance, virulence.