

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

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de l'environnement
Filière : Biologie et Physiologie Animale Comparée
Option : Bioressource Animale et Biologie intégrative



Réf :.....

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

MASTER

Thème

**Effet du liquide folliculaire et des cellules
oviductales prélevés de vaches de différents
états corporels sur la mobilité et le statut
oxydatif des spermatozoïdes bovins**

Présenté par :
MAMACHE LOUIZA & TABET CHAFIAA
Soutenu le : **15 Juin 2016**

Devant le jury composé de :

Mme : MOUHOU B C
Mr : NAIT MOULOUD M

Professeur Président
MAA Encadreur

Mr : REDJDAL H
Mr : IGUER-OUADA

MAA Examineur
Professeur Invité

Année universitaire : 2015 / 2016

Remerciements

Au nom de DIEU, qui nous a donné la force, la volonté et la patience durant toutes ces années d'étude. Et qui nous a guidées pour réaliser ce travail.

Nous tenons à remercier tout particulièrement notre promoteur Mr NAIT MOULOUD M. qui nous a inspirées ce sujet et guidées dans ce travail.

Nous tenons à remercier tous ceux qui nous ont aidés de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Nos sincères remerciements vont aux membres de jury:
Mme MOUHOUB C, vous nous faite l'honneur et le plaisir d'accepter la présidence de jury.
Mr REDJDAL. H, nous vous remercions d'avoir accepté de notre travail et d'être membre de jury.

Nos sincères remerciements au notre invité le professeur Mr IGUER-OUADA. M.

Dédicaces

A mon cher père, Mamache Ahcene :

Tu m'as appris que le travail est un trésor. Tu es toujours là, tu m'encourages et tu me soutiens quelques soient les difficultés. Ce travail est aussi le tien. Merci beaucoup papa.

A mon cher oncle, Mamache Abd-Elkader :

Tu m'as appris que le travail est un trésor. Tu es toujours là, tu m'encourages et me soutiens quelques soient les difficultés. Ce travail est aussi le tien. Merci beaucoup oncle.

A la mémoire de ma très chère mère, qui repose en paix à celle qui j'ai toujours tant d'aimée

A mes sœurs : Ghania, Naima, Sabiha, Hayat, Safia.

Pour votre soutien au quotidien, avec tout mon amour.

A mes frères : Kamel, loinnas, Omar.

Merci pour vos prières et votre soutien sans faille. Que l'esprit d'amour règne toujours au milieu de nous.

A mes cousins, cousines et toute la famille Mamache.

A mes oncles, tantes, et toute la famille Guemouni.

A mes amis : Ferroudja, Linda, Louiza, Samia, Mlahna, Sabiha, Fatima, Nadia, Nadjoua, Dji-dji, khalissa, Loula, Imane, Donia, Siham, Malia

A mon binôme Chafiaa, et toute sa famille.

A tous mes collègues de promotion BRABI.

A tous ceux qui m'aiment et j'aime, merci pour tous.

A tous mes enseignants ; Pour avoir contribué à ma formation.

LOUIZA

Je dédie ce modeste travail à :

Ma très chère maman, KHOUMCHANE SAFIA ;

Tous les mots du monde ne sauraient exprimer mon respect, et ma considération pour tes sacrifices. Tu es celle que je ne parviendrais jamais à égaler par ta force, ta gentillesse et ton courage à toute épreuve. Je t'aime mère.

Mon cher père, TABET MALEK et sa mémoire ;

Malgré que DIEU ait voulu que je ne grandisse pas auprès de toi, sache que ton amour restera à jamais présent en moi, et je sens toujours que t'es mon ange gardien. Je t'aime père.

Mes frères YACINE et KAMEL.

Mon très cher frère FARID et sa fiancée DEHIA.

Ma sœur GHANIA.

Ma sœur FARROUDJA et sa famille.

La mémoire de ma grande mère TASAADITE.

Cher TAHAR BOULKARIA et toute sa famille.

Tous les villageois de MAHOUDA.

Mon binôme LOUISA ainsi que mes collègues SONIA et DALILA.

Que ce travail soit témoignage de ma reconnaissance sincère.

Mes amis ;

BOBY, HALIM, DADOU, LYACE, DJAMEL et les filles du 17 Octobre;

Pour votre amitié, les moments passés ensemble, ainsi que votre soutien moral.

Très cher FAFA ;

Sans ton aide, tes encouragements et tes conseils, ce travail n'aurait jamais vu le jour.

A tous mes collègues et mes enseignants ;

Tous ce qui me connaît sans exception, je vous aime.

CHAFIAA

Sommaire

Liste des abréviations

Liste des tableaux

Liste des figures

Introduction.....1

Partie théorique

Chapitre 1 : Anatomie et physiologie de l'appareil reproducteur des bovins

1.1. Anatomie de l'appareil reproducteur femelle.....3

1.1.1. Organes sexuels primaires.....3

1.1.2. Organes sexuels secondaires.....3

1.2. Physiologie de l'appareil reproducteur femelle.....4

1.2.1. L'ovogenèse.....4

1.2.2. Folliculogenèse.....5

1.2.3. Cycle oestral de vache.....7

1.2.4. Les régulations hormonales du cycle oestral.....8

1.3. Anatomie de l'appareil reproducteur mâle.....10

1.3.1. Testicules.....10

1.3.2. Les voies spermatiques.....10

1.3.3. Les glandes annexes.....11

1.4. Physiologie de l'appareil reproducteur mâle.....11

1.4.1. La spermatogenèse.....11

1.4.2. Régulation de la fonction sexuelle mâle.....11

1.4.3. Les spermatozoïdes.....12

1.5. La fécondation.....13

1.5.1. Capacitation.....13

1.5.2. Réaction acrosomiale.....13

1.5.3. La fusion des gamètes.....13

Chapitre 2 : La relation entre l'alimentation et la reproduction

2.1. Alimentation, nutrition et reproduction.....14

2.2. La nutrition énergétique et la reproduction.....14

2.3. Le déficit énergétique chez la vache15

2.4. Évaluation du bilan énergétique.....16

2.4.1. Évaluation du bilan énergétique par estimation des entrées et sorties d'énergie.....	16
2.4.2. Évaluation par la note d'état corporel.....	17
2.4.3. Évaluation du bilan énergétique par les paramètres biochimiques.....	17

Chapitre 3 : Techniques de collecte et d'analyse de sperme

3.1. Techniques de collecte du sperme épидидymaire.....	19
3.2. Evaluation de la qualité du sperme.....	20
3.2.1. Examens macroscopiques.....	20
3.2.2. Examens microscopiques.....	21
3.3. Evaluation de la mobilité spermatique.....	23
3.3.1. Évaluation subjective de la motilité.....	24
3.3.2. Evaluation objective de la motilité.....	25

Chapitre 4 : Le stress oxydatif

4.1. Le stress oxydatif.....	27
4.1.1. Principaux radicaux libres.....	27
4.1.2. Mécanismes et sources de production des radicaux libres	27
4.2. Dommages irréversibles des radicaux libres sur les spermatozoïdes.....	29
4.3. Les systèmes de régulation des radicaux libres protégeant les spermatozoïdes.....	30
4.3.1. Définition et catégories des antioxydants	30
4.4. Évaluation du stress oxydatif des spermatozoïdes.....	31
4.4.1. Évaluation de la peroxydation lipidique membranaire des spermatozoïdes par le test TBARS	31
4.5. Évaluation de l'activité anti-oxydante des spermatozoïdes.....	32
4.5.1. Evaluation par l'ABTS.....	32
4.5.2. Dosage de l'activité de la catalase.....	32
4.6. Test de l'hémoglobine.....	32

Partie expérimentale

Chapitre 1 : Matériels et méthodes

1.1. Matériel	33
1.1.1. Matériel biologiques.....	33
1.1.2. Matériels de laboratoire.....	34
1.1.3. Produits chimiques.....	35
1.2. Méthode.....	36

1.2.1. Préparation des échantillons.....	36
1.2.1.1. Échantillons prélevés des matrices.....	36
1.2.1.2. Prélèvement du sperme épидидymaire des testicules.....	37
1.3. Protocole expérimental.....	38
1.3.1. Dilution du sperme.....	38
1.3.2. Dilution des échantillons de liquide folliculaire et de cellules oviductales.....	38
1.3.3. Co-incubation des échantillons avec le sperme.....	39
1.3.3.1. Pour l'étude de la mobilité.....	39
1.3.3.2. Pour le test à l'hémoglobine.....	39
1.4. Analyses statistiques.....	40

Chapitre 2 : Résultats et discussions.

2.1. Résultats.....	42
2.1.1. Effets du liquide folliculaire.....	42
2.1.1.1. L'effet du liquide folliculaire (LF) sur la mobilité globale.....	42
a. Comparaison des effets des liquides folliculaires par rapport au témoin.....	42
b. Comparaison des effets de LF du vache de déférent BCS entre eux.....	42
c. Évolution de la mobilité globale dans le temps	42
2.1.1.2. Effet du liquide folliculaire sur les sous-populations de spermatozoïdes.....	45
a. Description des sous-populations de spermatozoïdes (classes).....	45
b. Effet du LF proviens de vache de déférent BCS sur le pourcentage de spermatozoïdes assignés à la class 2.....	46
b.1. Comparaison des effets des liquides folliculaires par rapport au témoin.....	46
b.2. Comparaison des effets de LF de déférent BCS entre eux.....	46
b.3. Évolution des effets en fonction du temps d'incubation.....	46
2.1.1.3. Étude du statut oxydatif des spermatozoïdes.....	49
a. Effets de la présence du liquide folliculaire (par rapport aux témoins).....	49
b. Comparaison des effets de LF de déférent BCS.....	49
c. Évolution de l'absorbance de l'HG pour chaque BCS en fonction du temps.....	49
2.1.2. Effet des cellules oviductale.....	52
2.1.2.1. Effet des cellules oviductale sur la mobilité totale.....	52
a. Effet des cellules oviductales par rapport au témoin.....	52
b. Comparaison des effets de CO proviens de vache de déférent BCS entre eux.....	52
c. Évolution dans le temps.....	52

2.1.2.2. Effet des cellules oviductales sur les sous populations des spermatozoïdes.....	55
a. Description des classes.....	55
b. Effet du CO proviens de vache de déférent BCS sur la sous-population des spermatozoïdes les plus rapides (SP3).....	56
b.1. Effet des cellules oviductales par apport au témoin	56
b.2. Comparaison des effets des CO de chaque BCS entre eux.....	56
b.3. Évolution du pourcentage des spermatozoïdes les plus rapides dans le temps.....	56
2.1.2.3. Statut oxydatif.....	60
a. Effet des cellules oviductales par rapport aux témoins.....	60
b. Comparaison des effets des CO de chaque BCS entre eux.....	60
c. Évolution en fonction de temps.....	60
2.2. Discussions.....	63
2.2.1. Effets du liquide folliculaire.....	63
2.2.2. Effets des cellules oviductales.....	64
Conclusion	66

Références bibliographiques

Liste des abréviations

ABP	: Androgen Binding Protein.
ABTS	: 2, 2'- Azinobis-(3-Ethylbenzothiazoline-6-Sulphonic Acid Diamonium Salt.
ADN	: Acide Désoxyribonucléique.
AGNE	: Acides Gras Non Estérifiés.
ALH	: Amplitude Lateral Head.
BCF	: Beat Cross Frequency.
BCS	: Body Condition Scoring.
BFGF	: Basic Fibroblast Groth Factor.
BMP	: Bone Morphogenetic Proteins.
BST	: Bovin Somatotropine.
CASA	: Computer-Assisted-Semen-Analysis.
CAT	: Catalase.
CO	: Cellules oviductales.
Cu-SOD	: Super-Oxyde Dismutase À Cuivre.
DPPH	: 1, 1-Diphenyl-2-Picrylhydrazyl.
EGF	: Epidermal Groth Factor.
ELISA	: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay.
FSH	: Follicle Stimulating Hormone= Hormone Folliculostimulante.
GH	: Groth Factor= Hormone De Croissance.
GnRH	: Gonadotrophin Releasing Hormone= Gonadolibérine.
GR	: Glutathion Réductase.
HDL	: High Density Lipoprotein.
HG	: Hémoglobine.
Hz	: Hertz.
HOST	: Test Hypo-Osmotique.
H₂O₂	: Hydrogene Peroxide.
IGF	: Insulin-like Groth Factor.
IGFBP	: Insuline-like Groth Factor Binding Proteins.
IGF-I	: Insuline-like Groth Factor I.
IGF-II	: Insuline-like Groth Factor II.
IGFs	: Insuline Growth Factors Systèmes.
ITEB	: Institut Technique De l'Élevage Bovin.

LF	: Liquide Folliculaire.
LH	: Luteinizing Hormone= Hormone Lutéinisante
LIN	: Linearity.
LOO•	: Radicaux Lipidiques Peroxyes.
MDA	: Malon-Dialdéhyde.
MSI	: Matière Sèche Ingérée
(Mn-SOD)	: Super-Oxyde Dismutase A Manganèse.
Na-Cl	: Chlorure De Sodium.
NEC	: Note d'État Corporel.
Nm	: Nanomètre.
02•	: Anion Super-Oxyde.
OH•	: Radical hydroxyl.
P4	: Progestérone.
PDI	: Protéines Digestibles Dans l'Intestin.
PGF2 α	: Prostaglandine.
SCA	: Sperm Class Analyser.
SOD	: Super-Oxyde Dismutase.
SP	: Sous Population.
s.p	: Solution Physiologique.
spz	: Spermatozoides.
Str	: Straightness.
TBARS	: Thiobarbituric Acid Reactive Substances.
TGFβ	: Transforming Groth Factors β .
UFL	: Unité Fourragère Lait.
UVA	: Lumière Ultraviolette A.
UVB	: Lumière Ultraviolette B.
VAP	: Velocity Straight Pathway.
VCL	: Velocity Curved Line.
VSL	: Velocity Straight Line.
XOR	: Xanthine Oxydoréductase.
ZP	: Zone Pellucide.

Liste des tableaux

Tableau 1 : Principales caractéristiques du follicule bovin aux différents stades de son développement	6
Tableau 2 : Principales hormones impliquées dans le contrôle du cycle œstral de la vache.....	9
Tableau 3: Classement du sperme en fonction de l'examen macroscopique. Recommandations de la société de Theriogenology	21
Tableau 4: Note d'appréciation subjective de la mobilité massale des spermatozoïdes dans un échantillon	24
Tableau 5: Caractéristiques des sous-populations de spermatozoïdes détectées par les analyses statistiques multi variées.....	45
Tableau 6: Caractéristiques des sous-populations de spermatozoïdes révélées par les analyses statistiques multi variées.....	55

Liste des figures

Figure 1 : Appareil reproducteur de la vache.	3
Figure 2 : Diagramme ovarien représentant les étapes du développement folliculaire vers l'ovulation et le corps jaune ou l'atrésie	5
Figure 3 : Appareil reproducteur du taureau	10
Figure 4 : Contrôle neuroendocrinien de l'appareil génital masculin	12
Figure 5 : Anatomie du spermatozoïde de taureau	13
Figure 6 : Évolution comparée de l'appétit et des besoins autour du vêlage (UFL, Protéines Digestibles dans l'Intestin (PDI) et calcium).....	16
Figure 7: Modifications morphologiques des spermatozoïdes soumis au test hypo-osmotique.....	23
Figure 8: Représentation schématique des différentes vitesses mesurées par CASA. VSL vitesse linéaire, VCL trajectoire, STR : la rectitude, LIN : vitesse curviligne, VAP : vitesse moyenne de la : linéarité.....	26
Figure 9 : Dimérisation de l'acide Thio-barbiturique.....	31
Figure 10 : matrice d'une vache récupérée après abattage.....	33
Figure 11 : Testicule d'un taureau récupéré juste après l'abatage.....	33
Figure 12 : Hémoglobine de la vache.....	34
Figure 13 : Analyseur informatique de marque SCA utilisé pour mesurer les caractéristiques du mouvement des spermatozoïdes.....	34
Figure 14 : Spectrophotomètre visible VIS – 7220 G.....	35
Figure 15: Sonicateur VCX 130 (130 watts).....	35
Figure 16 : centrifugeuse de marque Sigma.....	35
Figure 17 : Figure représentant deux ovaires d'une vache (a)et le liquide folliculaire aspiré à partir de ces deux ovaires (b).....	36
Figure 18 : Prélèvement des cellules oviductales.....	36
Figure 19: Testicule après l'avoir dépourvu de la tunique vaginale.....	37
Figure 20 : Epididyme et canal déférent isolés du testicule.....	37
Figure 21 : La technique de rinçage rétrograde « retrograde-flushing »	38
Figure 22 : Effet de liquides folliculaires prélevés de vaches de différents BCS sur le pourcentage de spermatozoïdes mobiles (motilité totale)	43

Figure 23 : Évolution du pourcentage de spermatozoïdes mobiles pour chaque BCS en fonction du temps d'incubation.....	44
Figure 24: Effet du liquide folliculaire prélevé de vaches de différents BCS sur le pourcentage de spermatozoïdes assignés à la classe 2.....	47
Figure 25: Évolution du pourcentage de spermatozoïdes assignés à la classe 2 pour chaque BCS en fonction du temps d'incubation.....	48
Figure 26: Effet du BCS sur la concentration de l'hémoglobine exprimée par l'absorbance à 412 nm.....	50
Figure 27: cinétique de dégradation de l'HG exposée à H ₂ O ₂	51
Figure 28: Effet des cellules oviductales prélevées de vaches de différents BCS sur le pourcentage de spermatozoïdes mobiles (motilité totale).....	53
Figure 29 : Évolution du pourcentage de spermatozoïdes mobiles pour chaque BCS en fonction du temps d'incubation.....	54
Figure 30: Effet des cellules oviductales prélevées de vaches de différents BCS sur le pourcentage de spermatozoïdes assignés à la classe 3.....	58
Figure 31: Évolution du pourcentage de spermatozoïdes assignés à la classe 3 pour chaque BCS en fonction du temps d'incubation.....	59
Figure 32: Effet du BCS sur la concentration de l'hémoglobine exprimée par l'absorbance à 412 nm	61
Figure 33: cinétique de dégradation de l'HG exposée à H ₂ O ₂	62

INTRODUCTION

Introduction

Le processus de la reproduction sexuée repose sur l'association de deux copies d'un même génome (Pfeifer et *al.*, 2001 ; Conrad et *al.*, 2005), ce processus chez les mammifères dépend d'une part des facteurs internes reliés à l'animal lui-même, et d'autre part des facteurs externes reliés à l'environnement.

La fusion de l'ovule avec le spermatozoïde se fait dans les voies génitales féminines et son succès dépend de l'impact de ces voies sur ces gamètes.

De nombreuses études se sont focalisées sur l'action du liquide folliculaire et des cellules oviductales sur la réussite de la fécondation (Bureau, 2000). Plusieurs recherches ont démontré que le liquide folliculaire et les cellules oviductales de la vache interagissent très étroitement avec les spermatozoïdes du taureau.

Les cellules oviductales bovines permettent de finaliser la maturation du spermatozoïde et prennent part au processus de reconnaissance entre l'ovule et le spermatozoïde. Le liquide folliculaire, quant à lui, semble contenir des substances qui améliorent l'hyper-activation des spermatozoïdes et leur maturation nucléaire.

Par ailleurs, l'environnement des gamètes doit ajuster la concentration des radicaux libres de façon à permettre un niveau optimal d'oxydation (Chabory et *al.*, 2009). Certaines protéines trouvées dans le fluide oviductal, dont les spermatozoïdes sont dépourvus, dégradent certains radicaux libres et protègent les capacités du spermatozoïde et sa mobilité (Lapointe, 1998).

D'autre part, la note de l'état corporel est un indicateur du bilan énergétique, il est utilisé non seulement pour le suivi d'élevage et l'évaluation de la conduite nutritionnelle du troupeau mais aussi, dans de nombreuses enquêtes, pour évaluer ses relations aussi bien avec les paramètres de production qu'avec les paramètres de reproduction. Les bovins ont besoins d'une excellente conduite nutritionnelle du troupeau puisque tout déséquilibre alimentaire affecte les spermatozoïdes et les ovaires, ce qui dégrade les performances de reproduction.

L'objectif de la présente étude est d'évaluer l'impact des cellules de l'oviducte et de liquide folliculaire sur la mobilité et le statut oxydatif des spermatozoïdes, en fonction du niveau alimentaire des vaches traduit par leur état corporel afin de tenter une amélioration des systèmes de reproduction et de développement chez l'espèce bovine.

Le présent mémoire est structuré en deux parties. La première partie composée de quatre chapitres est une synthèse bibliographique abordant des rappels sur l'anatomie et la physiologie de l'appareil reproducteur des bovins, la relation entre la nutrition dans la

reproduction et l'état corporel, les méthodes de collectes et d'évaluation de la mobilité spermatique, et en fin, le stress oxydatif et son évaluation.

La seconde partie représente le matériel et les techniques utilisées pour atteindre l'objectif fixé, les résultats générés et leur discussion. L'ensemble est terminé par une conclusion.

PARTIE THEORIQUE

CHAPITRE 1

**ANATOMIE ET PHYSIOLOGIE DE L'APPAREIL
REPRODUCTEUR DES BOVINS.**

Chapitre 1 : Anatomie et physiologie de l'appareil reproducteur des bovins

1.1. Anatomie de l'appareil reproducteur femelle

Le système reproducteur femelle de l'espèce bovine est composé de plusieurs organes, les quels peuvent être divisés en deux catégories, soit les organes sexuels primaires et secondaires.

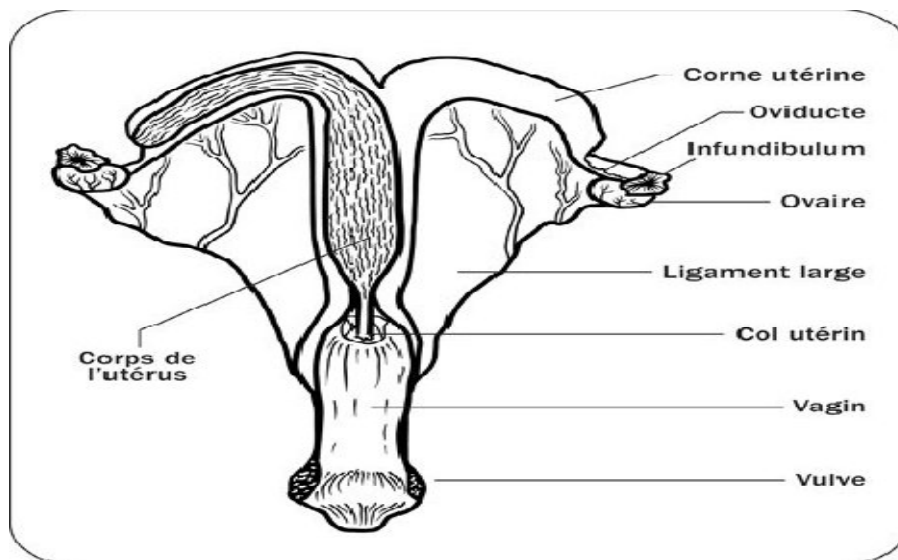


Figure 1 : Appareil reproducteur de la vache (Barone, 2001).

1.1.1. Organes sexuels primaires

Les ovaires Sont des organes pairs, situés dans la cavité abdominale et doués d'une double fonction : exocrine gamétogénèse (ovogénèse) et endocrine hormonogénèse qui régule la vie génitale par la sécrétion de deux hormones importantes : la progestérone et l'œstrogène (Deletang et *al.*, 2002 ; Thibault et *al.*, 1978).

Chez la vache, ils sont petits, ovoïdes, de taille variable selon l'âge et le stade du cycle œstral (3 à 5 cm de long, 2 à 3 cm de large et 1 à 2 cm d'épaisseur), de consistance ferme, leur forme est irrégulièrement bosselée par des structures tels que les follicules à divers degrés de développement et les corps jaunes (Deletang et *al.*, 2002 ; Barone, 1978)

1.1.2. Organes sexuel secondaires

Oviductes

L'oviducte est une structure importante du tractus génital, situé entre l'ovaire et l'utérus. Il est constitué de trois sections principales, soit l'infundibulum près de l'ovaire, l'ampoule et l'isthme qui précède l'utérus. Sa longueur est d'environ 25 cm chez l'espèce

porcine (Hunter, 1988). Il a été démontré maintes fois que l'oviducte exerce un rôle essentiel dans le processus de fécondation des espèces.

C'est au niveau de l'ampoule de l'oviducte qu'a lieu de la fécondation. Il permet également de finaliser la maturation des gamètes mâles et femelles grâce à ses constituants cellulaires et leurs sécrétions.

Les parois sont constituées de cellules sécrétoires et ciliées, ces dernières étant retrouvées en très grand nombre dans l'ampoule (Hunter, 1988). Les cellules sécrétoires produisent des glycoprotéines dont certaines ont été reconnues comme éléments pouvant se lier aux spermatozoïdes et aux ovules (Araki, 1998). Leurs actions biologiques suggèrent fortement leur implication dans le contrôle de la fécondation et du développement (Mavrog, et *al.*, 1997). Responsable du transport des gamètes vers le site de fécondation et de l'embryon vers l'utérus, possède des récepteurs de LH qui permettent un contrôle hormonal des contractions de l'oviducte (Gawronska et *al.*, 1999).

L'utérus

C'est l'organe de la gestation, de l'implantation de l'oeuf, du développement embryonnaire, et de la parturition. Il est constitué de deux cornes utérines, du corps et du col ou Cervin, barrière entre l'utérus et le vagin (Thibault, 2001 ; Levasseur, 2001). C'est l'organe qui présente les plus grandes variations au cours de la vie, il est très petit à la naissance et de faible volume jusqu'à la puberté. Chez l'adulte, il varie au cours des cycles sexuels régresse dans la vieillesse. Les ruminants présentent un utérus bipartite unifié sur une courte partie caudale ou corps, celui-ci possède une communication simple et médiane avec le vagin (Baronne, 1978).

Le vagin

Il s'étend du col de l'utérus à la vulve ; c'est un conduit cylindroïde musculo-membraneux (Deletang et *al.*, 2002). Contrairement au rat et à la truie où l'utérus est le réceptacle du sperme lors de l'éjaculation, chez la vache, c'est plutôt le vagin qui recevra le sperme suite à l'accouplement (Baronne, 1978).

1.2. Physiologie de l'appareil reproducteur femelle

1.2.1 L'ovogenèse

L'ovogenèse, débutée lors du développement embryonnaire, s'est arrêtée à la Prophase méiotique, laissant les ovocytes primaires entourés de cellules folliculeuses. Le nombre de ces follicules primordiaux est 235000 à la naissance chez la vache (Mailot et *al.*, 2001), diminuera avec l'âge par dégénérescence. Au cours de la succession des cycles, certains ovocytes iront

jusqu'à la maturation et la ponte ovulaire, tandis que la majorité dégénérera dans les follicules atresiques.

Quelques centaines d'ovocytes primordiaux achèveront ainsi la première division de la méiose pour évoluer en ovocyte secondaire avec émission du premier globule polaire, suivie de la seconde division méiotique. C'est au stade métaphase de cette division qu'a lieu l'ovulation, et la maturation finale se déroulera lors de la fécondation, avec émission du second globule polaire (Bosio, 2006).

1.2.2. Folliculogenèse

La folliculogenèse est l'ensemble des processus de croissance et de maturation des follicules ovariens entre le stade de follicule primordial et l'ovulation. Sa finalité biologique est la production, lors de chaque cycle menstruel, d'un (pour les espèces mono-ovulantes) ou plusieurs (pour les espèces poly-ovulantes) ovocytes aptes à la fécondation et au développement (Froment, 2007).

Plusieurs auteurs ont étudié les kystes ovariens, (Seguin, 1980 ; Garverick, 1997 ; Peter et *al.*, 1995). Ces auteurs décrivent le kyste ovarien comme une structure lisse, d'un diamètre égal ou supérieur à 20, voire 25 mm, et persistant pendant au moins 10 jours sur l'ovaire en présence ou non d'un corps jaune.

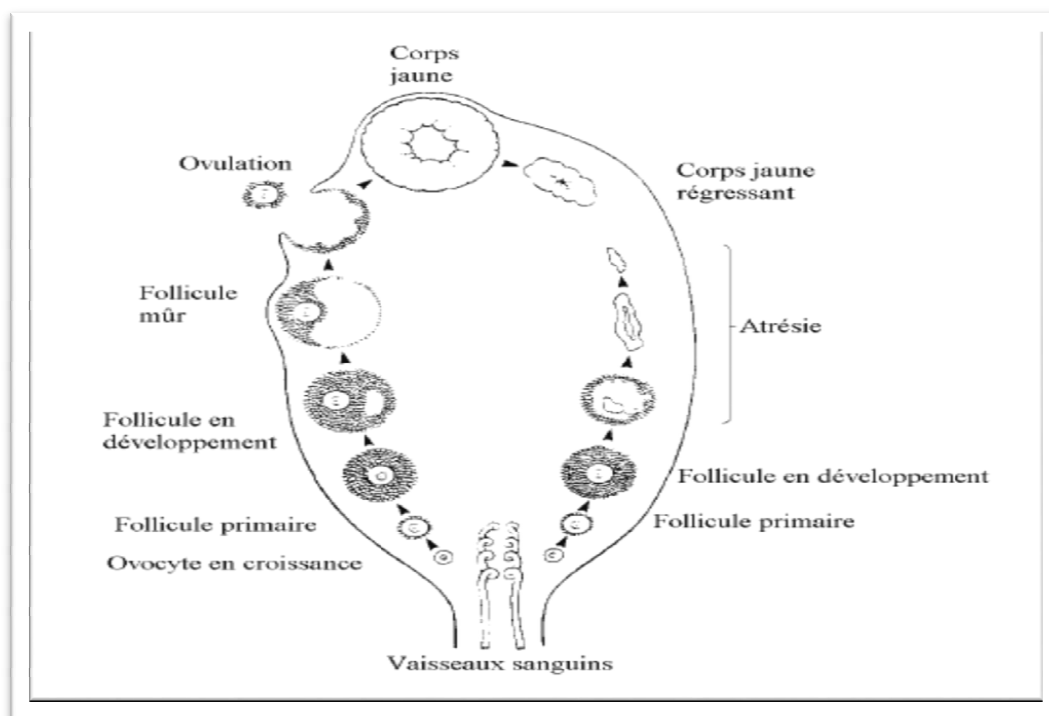


Figure 2 : Diagramme ovarien représentant les étapes du développement folliculaire vers l'ovulation et le corps jaune ou l'atresie, d'après Peters et *al.* (1995).

A partir de la puberté, chaque jour, environ 80 follicules primordiaux débutent leur croissance par multiplication des cellules folliculaires et développement de l'ovocyte (Mialot et *al.*, 2001). Cette croissance aboutit successivement aux stades de follicule primaire, secondaire puis tertiaire au cours de cette croissance, les follicules acquièrent également des récepteurs répondre à une stimulation gonadotrope : récepteurs à LH pour les cellules de la thèque interne et récepteurs à FSH pour les cellules de la granulosa (Ennuyer, 2000).

La maturation concerne que quelques centaines de follicules pendant la période de la vie génitale, est communément décrite par les concepts de recrutement, sélection et dominance sous l'influence des gonadotrophines. Le recrutement est l'entrée en croissance terminale d'un groupe de follicules gonado-dépendants. La sélection est l'émergence parmi les follicules recrutés du follicule ovulatoire. Enfin, la dominance correspond à l'amorce de la régression des autres follicules recrutés et au blocage du recrutement d'autres follicules (Ennuyer, 2000).

Tableau 1 : Principales caractéristiques du follicule bovin aux différents stades de son développement (Bekers et *al.*, 1996)

Stade folliculaire	Nombre de cellules folliculaires	Structures en formation	Diamètre folliculaire (µm)	Diamètre ovocytaire (µm)
Primordial	30 cellules aplaties	Membrane basale	30-50	20-35
Primaire	Couche de cellule (27-58) cuboidales	Membrane de Slavjanski	40-60	30-40
Secondaire	Couche multiples de cellules	Zone pellucide. Thèques	200-300	60
Tertiaire	Couche multiple de cellules	<i>Comulus oophorus</i>		100-130
Stade preovulatoire ou de (de Graaf)	Couche multiples de cellules, Différenciation des cellules folliculaires en cellules degranulosa et <i>cumulus</i>	Acquisition de la compétence ovocytaire, reprise de la méiose	$2 \cdot 10^4$	150

Le liquide folliculaire

Le liquide folliculaire participe aux étapes finales de la maturation de l'ovocyte. Il contrôle avant l'ovulation, les dernières modifications de transcription qui permettront à l'embryon d'effectuer ses synthèses protéiques aux premières divisions de segmentation. Le liquide folliculaire pourrait également protéger l'ensemble ovocyte-cumulus contre les enzymes protéolytiques qui attaquent la paroi du follicule au moment de l'ovulation. Il est présent sur le site de fécondation en parallèle avec la capacitation des spermatozoïdes dans l'oviducte et le transport de l'ovocyte de l'ovaire à l'oviducte lors de l'ovulation (Hansen *et al.*, 1991).

Le liquide folliculaire contiendrait des facteurs chimiotactiques, qui stimulent le métabolisme des gamètes et qui induisent l'hyper activation et la réaction acrosomique des spermatozoïdes (Zhu *et al.*, 1994).

Des taux élevés de vitamine C dans la sécrétion folliculaire et d'hypo taurine (Meizel *et al.*, 1980) suggèrent un rôle important de ces sécrétions dans la protection des gamètes et de l'embryon contre les phénomènes d'oxydation.

Les acides aminés sont présents naturellement dans le liquide folliculaire et seraient la bonne réalisation des étapes précédant le développement embryonnaire (Waston *et al.*, 2000). Parmi les différents acides aminés ; l'hypo taurine aurait des effets protecteurs sur les dommages causés par le stress oxydatifs (Guerin *et al.*, 1995).

1.2.3. Cycle œstral de vache

La vache est une espèce poly estrienne de type continu avec une durée moyenne de cycle de 21/22 jours chez la femelle multipare et de 20 jours chez la génisse. L'activité sexuelle débute à la puberté, caractérisée par l'apparition périodique de l'œstrus (Mialot *et al.*, 2001). L'œstrus ou chaleur est la période d'acceptation du mâle et de la saillie. C'est la période de maturité folliculaire au niveau de l'ovaire, suivie de l'ovulation. Elle dure de 6 à 30 heures, et se caractérise par des manifestations extérieures. L'ovulation a lieu 6 à 14 h après la fin de l'œstrus et est suivie par la formation du corps jaune et d'installation de la fonction lutéale (Derivaux *et al.*, 1986).

Le cycle sexuel comprend 4 phases centrées sur l'œstrus qui est la période d'acceptation du mâle (Derivaux, 1971 ; Vaissaire, 1977).

Le pro œstrus

Cette phase dure 4 jours et correspond à la période de préparation et de maturation folliculaire.

L'oestrus

C'est la période de maturité folliculaire suivie de l'ovulation. Sa durée est brève : 13 à 23 heures

Le post œstrus

Correspond à la phase de formation et de fonctionnement du corps jaune avec installation d'un état pré gravidique de l'utérus. Cette période est également appelée phase lutéale et dure environ 8 jours.

Le di œstrus

C'est la période de repos sexuel, correspondant à la phase d'involution, de régression du corps jaune et retour à l'état initial. Cette dernière phase dure 8 jours environ (Marien, 1993).

1.2.4. Les régulations hormonales du cycle œstral

Après l'ovulation, qui marque le début du cycle, le corps jaune se forme avec la sécrétion de progestérone qui détermine la durée du cycle œstral. Elle exerce en effet un rétrocontrôle négatif sur la sécrétion de GnRH, donc sur la sécrétion de LH, ce qui provoque donc une nouvelle ovulation.

La diminution de sécrétion de GnRH n'empêche pas une sécrétion de FSH, ce qui permet le démarrage de la croissance des follicules recrutés et donc la persistance de vagues folliculaires pendant la phase lutéale. La régulation au sein des vagues s'effectue donc par des molécules synthétisées par les follicules en croissance. Ils sécrètent en effet des œstrogènes qui, en présence de progestérone et à une concentration peu élevée, exercent un rétrocontrôle négatif sur la sécrétion de FSH. Ce rétrocontrôle est renforcé par l'action de l'inhibine qui provoque une inhibition de synthèse et de libération des gonadotrophines. Enfin, un peptide présent dans le liquide folliculaire, la FSHRBI, semble exercer une inhibition marquée sur la fixation de la FSH aux récepteurs présents sur les cellules de la granulosa.

En l'absence de gestation, l'utérus sécrète la prostaglandine F2 α qui induit la lutéolyse. Le rétrocontrôle négatif sur la GnRH disparaît et la sécrétion pulsatile de LH augmente en fréquence. Le folliculaire sélectionné peut ainsi poursuivre sa croissance et sa maturation. Il sécrète alors des œstrogènes qui, en l'absence de progestérone et à une concentration élevée, exercent un rétrocontrôle positif sur l'hypothalamus et la sécrétion de GnRH (Feini et *al.*, 1995).

Tableau 2 : Principales hormones impliquées dans le contrôle du cycle œstral de la vache
(Bousquet, 1989)

Organe	Hormone	fonction
Hypothalamus	GnRH	Relâchement de la LH et FSH
HP antérieur	FSH	Stimule croissance folliculaire
	LH	Induit maturation finale et ovulation du follicule + maintien du Corp jaune
Corp. jaune	Progestérone	Relâchement utérus, sécrétion utérines et contrôle sécrétion LH
Follicule	Œstrogènes	Sécrétion de LH et de FSH, stimule sécrétion de PGF, augmente la circulation sanguine du système génital.
	Inhibine	Inhibe la sécrétion de FSH
Uterus	Prostaglandine.	Induit la régression du Corp. jaune

1.3. Anatomie de l'appareil reproducteur mâle

L'appareil génital du taureau, représenté sur la figure 3, peut se décomposer en trois grandes parties (Taveau, 2012) :

- Les testicules ;
- Les voies spermatiques, incluant l'épididyme et le canal déférent ;
- Les voies uro-génitales, incluant, les glandes annexes et le pénis.

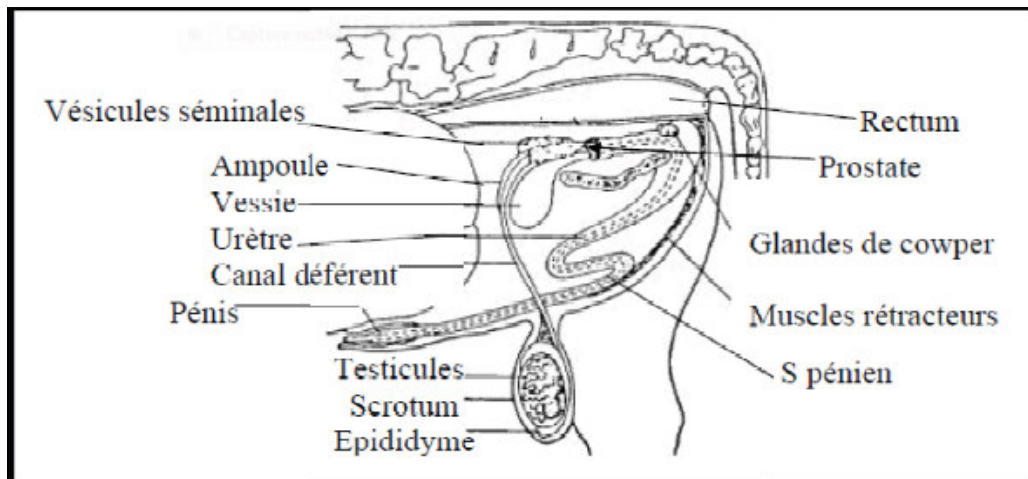


Figure 3 : Appareil reproducteur du taureau (Thibier, 1977).

1.3.1. Testicules

Les testicules sont des organes ovoïdes, bilobés, de couleur blanchâtre et, suspendus dans le scrotum en position verticale. Les testicules ont une origine méso néphrotique. Chez le taureau, ils descendent dans les enveloppes testiculaires avant même la naissance. Elles sont pourvues d'une fonction exocrine et endocrine. Le testicule est recouvert par une membrane fibreuse, résistante, non élastique, elles ont une longueur de 10 à 14 cm, une largeur de 6 à 8 cm et une épaisseur de 6 à 8 cm chez le taureau. Leur température doit être toujours inférieure de quelques degrés à celle du reste du corps. Les enveloppes testiculaires encore appelées bourses, sont formées de six membranes. Elles soutiennent et protègent les testicules, les voies spermatiques sont accolées (épididyme, canal déférent) et les vaisseaux sanguins qui les irriguent. (Chenoweth et *al.*, 2007)

1.3.2. Les voies spermatiques

A leur sortie du testicule, les spermatozoïdes ne sont pas matures : ils ne sont ni mobiles, ni féconds. La différenciation des spermatozoïdes appelée maturation s'effectue dans le conduit épидидymaire. L'épididyme phagocyte les spermatozoïdes dégénérés, réabsorbe le liquide testiculaire, sécrète des substances jouant un rôle dans la maturation des

spermatozoïdes. L'épididyme est constitué de trois parties : la tête, le corps et la queue. La tête couvre le testicule crâniens-dorsalement. La continuité de la tête de l'épididyme avec le testicule est assurée par les conduits efférents. Le corps de l'épididyme longe le testicule médialement et la queue rejoint le conduit déférent. Les trois parties de l'épididyme sont palpables, plus ou moins saillantes en fonction des individus, et de consistance homogène. La musculature de l'épididyme chasse les spermatozoïdes dans le conduit déférent pendant la phase préliminaire de l'éjaculation (Dacheux, 2001).

1.3.3. Les glandes annexes

Les glandes annexes ou glandes sexuelles accessoires présentent chez les mammifères de grandes variations anatomiques et physiologiques. Chez le taureau, les trois glandes sont : les glandes vésiculaires ou vésicules séminales, la prostate et les glandes bulbo-urétrales.

La palpation transrectale chez le taureau permet d'examiner ces glandes accessoires. Des terminaisons libres nerveuses se situent dans le tissu sous-épithélial et donnent de informations sensibles de douleur, pression et température. (Knobil et *al.*, 1988).

1.4. Physiologie de l'appareil reproducteur male

1.4.1. La spermatogenèse

La spermatogenèse est la différenciation cellulaire pour la production des spermatozoïdes à partir des spermatogonies souches. Elle commence à la puberté et continue au cours de la vie de l'animal. La méiose est l'étape de brassage génétique. Les cellules haploïdes : les spermatides, à partir des spermatogonies (diploïdes). La spermatogenèse est l'étape de différenciation cytoplasmique qui permet la formation de cellules mobiles (Dadoune et *al.*, 2001).

1.4.2. Régulation de la fonction sexuelle mâle

La fonction sexuelle mâle est essentiellement contrôlée par les sécrétions hormonales. L'hypothalamus sécrète un peptide appelé GnRH qui stimule la synthèse hypophysaire et la libération de deux hormones gonadotropes FSH et LH. Les cellules de Sertoli possèdent des récepteurs sensibles à la FSH. Les cellules de Leydig des testicules possèdent des récepteurs sensibles à la LH. La testostérone sécrétée par les cellules de Leydig intervient des caractères sexuels : primaires, secondaires et tertiaires. Les cellules de Sertoli produisent l'Inhibine qui exerce une rétroaction au niveau hypophysaire. Les interactions entre ces hormones contribuent à assurer un équilibre dynamique (Kabera, 2008).

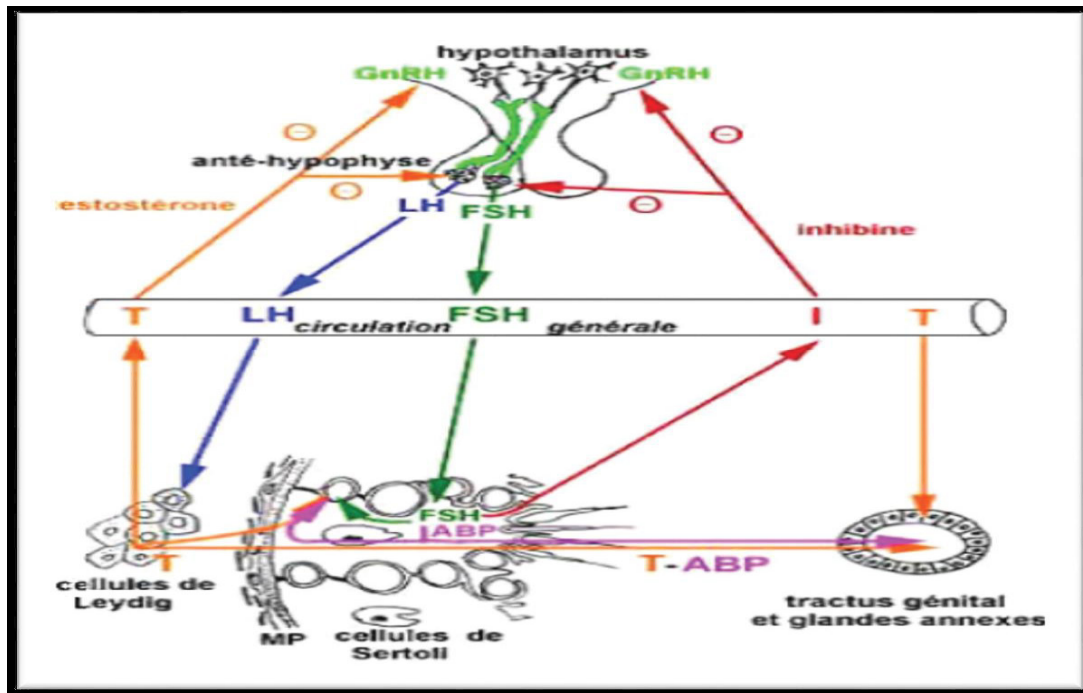


Figure 4 : Contrôle neuroendocrinien de l'appareil génital masculin

(Source:<http://spiral.univlyon1.fr/polycops/HistologieFonctionnelleOrganes/GenitalMasculin/gm6rd.html>)

1.4.3. Les spermatozoïdes

Le spermatozoïde est le produit final de la gamétogenèse chez le mâle, qui se produit dans les tubules séminifères des testicules. Le poids sec d'un spermatozoïde bovin est environ 16.5×10^{-12} g et son volume est environ 30 pm^3 . Les spermatozoïdes varient, selon les espèces, par leur forme, leur longueur et leur taille (Eddy et *al.*, 1994).

Les spermatozoïdes des mammifères sont composés de deux parties principales, la tête et le flagelle, qui sont reliées par la pièce intermédiaire. La tête est constituée de l'acrosome, du noyau, et de petites quantités de structure cytosquelettique, et de cytoplasme (Bangham, 1961).

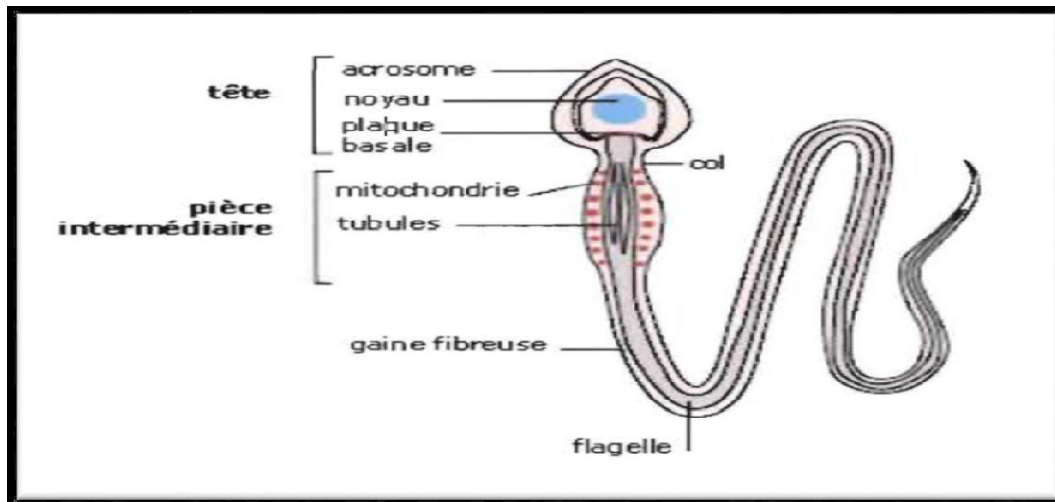


Figure 5 : Anatomie du spermatozoïde de taureau. (Yaye, 2009)

1.5. La fécondation

Le long voyage des spermatozoïdes tire à sa fin et le but ultime de cette grande aventure est sur le point de se concrétiser : la rencontre de l'ovule. Chez le bovin, un éjaculat comporte plus de 4 milliards de spermatozoïdes Le processus de fécondation comprend les étapes suivantes (Mann,1964) :

1.5.1. Capacitation

Les spermatozoïdes acquéraient leur pouvoir fécondant dans l'épididyme. La capacitation se définit comme étant la période de temps pendant laquelle les spermatozoïdes séjournent dans le tractus génital femelle avant qu'ils ne développent la capacité de féconder l'ovule (Chang,1968).

1.5.2. Réaction acrosomiale

Tous les changements qui se produisent au cours de la capacitation mèneront ultimement au déclenchement d'un processus irréversible appelé "réaction de l'acrosome". Celle-ci consiste en une fusion de la membrane plasmique avec la membrane externe de l'acrosome. Cela donne lieu à la formation de vésicules membranaires mixtes et des fenestrations au travers desquelles le contenu de l'acrosome est libéré. L'exposition de membrane interne de l'acrosome permettra au spermatozoïde de se lier à l'une des trois protéines ZP composant la zone pellucide de l'ovule, à l'aide des enzymes contenus dans l'acrosome (Crozet, 1991).

1.5.3. La fusion des gamètes

Après avoir traversé la zone pellucide, le spermatozoïde va s'immobiliser contre la membrane plasmique de l'ovocyte puis fusionner avec celle-ci pour entrer. Dans l'espèce bovine, le fluide d'oviducte participerait à la fusion des gamètes (Mugnier, 2009).

CHAPITRE 2

LA RELATION ENTRE L'ALIMENTATION ET LA
REPRODUCTION

Chapitre 2 : La relation entre l'alimentation et la reproduction

2.1. Alimentation, nutrition et reproduction

La fertilité de la vache laitière dépend de multiples facteurs : on peut souligner l'importance de la pathologie, de la conduite d'élevage, de la technicité de l'éleveur, de la qualité de l'insémination, ainsi que celle de l'environnement géographique.

Les auteurs s'accordent à dire que l'alimentation joue un rôle prépondérant dans la maîtrise de la reproduction. On considère que 60 % des troubles de reproduction sont liés à un problème alimentaire (Veillet, 1995). On peut suspecter une origine alimentaire des troubles de la reproduction lorsqu'un pourcentage élevé de vaches du troupeau présente des problèmes de fertilité ou de fécondité, par exemple, lorsque plus de 15 % des vaches sont en anoestrus à 40-50 jours *post-partum*.

L'intensité des signes dépend de la sévérité et de la durée du déséquilibre nutritionnel. Dans les cas modérés, on observe une perte d'état corporel ; les performances de reproduction sont altérées pendant une période limitée ; en outre, peu d'individus sont concernés. Lors de troubles alimentaires plus graves, une proportion plus importante d'animaux est affectée et la reproduction se détériore plus durablement (Ferguson, 1991).

2.2. La nutrition énergétique et la reproduction

L'impact de la nutrition sur la reproduction est reconnu depuis très longtemps. On rapporte que les sociétés anciennes étaient très au courant des effets de la nutrition et de lactation sur la reproduction. L'impact de l'énergie sur les performances en reproduction est clair et admis par tous. L'énergie est-elle pour autant l'aspect de la nutrition le plus important relativement à la reproduction. Il faut plutôt dire que toutes les nutriments ont leur importance afin de réaliser des performances de reproduction adéquates.

Tous les nutriments peuvent conditionner les performances de reproduction. En effet, Tout excès ou déficit en énergie, en azote, en minéraux et en oligo-éléments est préjudiciable aux performances de reproduction ; toute association de déséquilibres aggrave la dégradation de la fertilité (Paccard, 1995). Cependant, l'énergie est, l'aspect de la nutrition qui a le plus d'importance. D'un autre côté, il faut bien admettre que l'énergie est probablement l'aspect le plus difficile à gérer. Il faut se rappeler qu'à eux seuls, les glucides représentent autour de 70 % de la ration de la vache laitière, qu'elle soit tarie ou en lactation. La vache a besoin d'énergie en grandes quantités.

Au cours du *post-partum* et pendant une durée variable, la vache présente un bilan énergétique négatif dont la valeur et la durée dépendent des apports alimentaires, du niveau de production laitière, mais également des réserves corporelles acquises par l'animal au moment

du vêlage. Avant et après le vêlage, une sous-alimentation sévère (apports inférieurs de 10 à 20 % aux besoins requis) et prolongée de la vache affecte la fonction ovarienne, folliculaire et lutéale, et contribue à allonger la durée de l'anoestrus après le vêlage. Davantage que la valeur absolue de l'état corporel lors du vêlage, c'est la quantité et la durée des pertes en énergie (bilan énergétique négatif) qui affecteraient le délai nécessaire à l'obtention d'une gestation (Hanzen, 2005). Chez la vache laitière, l'augmentation de la capacité d'ingestion après vêlage est insuffisante pour assurer la couverture des besoins de début de lactation. La sous-alimentation est donc inévitable. Un accroissement du déficit énergétique (consécutif à une diminution des apports ou à une augmentation de production laitière) a des conséquences sur la sécrétion de LH (diminution de la fréquence et de l'amplitude des pulses de LH), la croissance folliculaire (diminution du nombre de gros follicules, absence d'ovulation du follicule dominant de la première vague de croissance folliculaire) et la production d'embryons en réponse à un traitement de super ovulation (diminution de la production totale d'embryons et de la production d'embryon viables).

Les mécanismes physiologiques qui peuvent lier nutrition, production laitière et reproduction sont complexes et certains ont bénéficiés de nombreux apports de la recherche ces dernières années. A l'interface entre ces trois fonctions on trouve l'hormone de croissance (GH pour Growth Hormone ou bST pour bovine Somatotropine), les systèmes des IGFs (Insuline growth factors), l'insuline, le glucose et la leptine. La fonction thyroïdienne pourrait elle aussi être impliquée mais elle a été très peu explorée chez les bovins.

2.3. Le déficit énergétique chez la vache

Le déficit énergétique est dû à une prise alimentaire qui augmente moins rapidement que les besoins énergétiques. En effet, la divergence d'évolution commence durant les derniers jours de lactation, où l'appétit diminue avant d'augmenter de nouveau après le vêlage. Mais les apports recommandés (métabolisme de base, production laitière, et croissance pour les primipares) sont multipliés par trois à quatre dès la deuxième semaine de lactation alors que l'appétit de l'animal met deux à quatre mois avant d'atteindre son maximum. La figure 6 illustre l'évolution des besoins alimentaires (UFL, Protéines Digestibles dans l'Intestin (PDI) et calcium) multipliés par trois, alors que la quantité de matière sèche ingérée (MSI) augmente plus tardivement. (Froment, 2007).

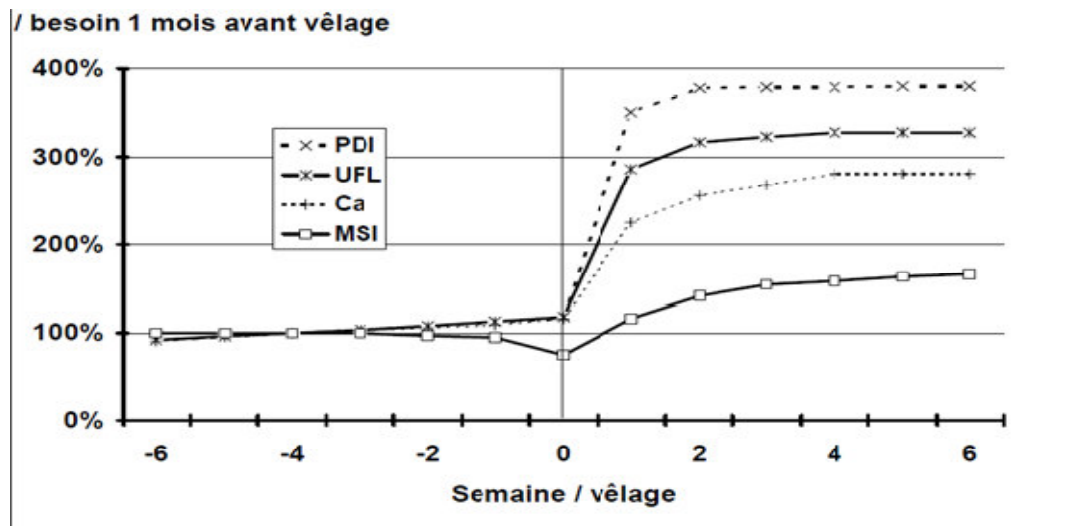


Figure 6 : Évolution comparée de l'appétit et des besoins autour du vêlage. (Froment, 2007).

La situation de déficit dure en moyenne jusqu'à six à douze semaines post-partum, voir quinze semaines avec un pic du déficit énergétique situé entre une et deux semaines post-partum. Cette situation induit une mobilisation des réserves contenues dans le tissu adipeux et des protéines d'origine osseuse et musculaire. Notons que la couverture des besoins énergétiques par l'alimentation n'est pas possible, elle nécessiterait des apports trop massifs et brutaux d'autant que les vaches laitières supportent relativement bien ce déficit. Il est cependant important de limiter cet amaigrissement à six à huit semaines de lactation.

2.4. Évaluation du bilan énergétique

L'état énergétique d'un animal n'est pas facile à apprécier. L'estimation de la valeur énergétique de la ration n'est pas suffisante car les quantités ingérées varient beaucoup entre les individus, notamment pendant le *post-partum*, et particulièrement pour les fourrages. La notation de l'état corporel, qui évalue l'état d'engraissement superficiel, est la méthode la plus couramment employée. Elle présente l'avantage d'être peu coûteuse en investissement et en temps. Son interprétation est moins sujette à caution que celle de la pesée, rendue délicate par les variations de poids des réservoirs digestifs et utérins (Wolter, 1992). Cette technique est complémentaire des dosages biochimiques.

2.4.1. Évaluation du bilan énergétique par estimation des entrées et sorties d'énergie

Le bilan énergétique des vaches laitières est d'une grande importance pour la gestion de la production, de la santé et de la reproduction.

Le bilan énergétique est généralement calculé comme l'entrée d'énergie moins la sortie d'énergie. Cependant, cela nécessite que l'on mesure l'apport alimentaire et les sources d'énergies sortantes (lait, entretien, croissance et gestation).

2.4.2. Évaluation par la note d'état corporel

L'appréciation du bilan énergétique est impossible individuellement en temps réel en élevage. La note d'état corporel le permet indirectement. Une vache qui maigrit beaucoup a subi un important pic de déficit énergétique (Chilliard *et al.*, 1987).

La couverture grasseuse de 4 points anatomiques arrières (base de la queue, tubérosité ischiatique, détroit caudal, ligne du dos) et de 2 points latéraux (pointe de la hanche, apophyses transverses et épineuses) est évaluée visuellement grâce à des grilles de notation comme celle établie par (Bazin, 1984). A chaque critère anatomique est attribuée une note de 0 (vache cachectique) à 5 (vache très grasse) ; la moyenne de ces 6 notes donne une note globale, dont la précision est évaluée au demi- point. Un point de note correspond à environ 20-25 kg de lipides chez un animal de 600 kg (Poncet, 2002).

La note d'état d'un animal permet de juger de son alimentation a posteriori. La quantité de graisse que l'animal possède résulte de ce que l'animal a digéré et utilisé. La perte d'état observée pendant cette période est le signe d'une mobilisation intense, parfois très rapide, des réserves corporelles. Bien que subjective, la méthode de notation de l'état corporel chez la vache peut être corrélée à d'autres mesures, objectives celles-ci, comme le poids vif ou la composition des tissus corporels.

La note d'état corporel reflète l'épaisseur de la graisse sous cutanée (Edmonson *et al.*, 1989). En lactation comme en période de tarissement, la notation de l'état corporel doit être faite à des intervalles réguliers. D'une manière générale, l'état corporel des animaux est un des indicateurs (avec les performances de production, les résultats de reproduction et la composition du lait) de l'efficacité et de la sécurité d'une ration (Froment, 2007).

2.4.3. Évaluation du bilan énergétique par les paramètres biochimiques

Le statut énergétique peut être évalué par le suivi des concentrations sanguines en glucose, acides gras non estérifiés (AGNE), cholestérol, corps cétoniques et insuline.

Le glucose est une molécule indispensable aux métabolismes énergétique cellulaire, lipidique, foetal, et à la production laitière (synthèse de lactose) (Vagueur, 1992).

Physiologiquement, la glycémie est maximale au vêlage, diminue pendant les deux premiers mois *post-partum*, puis croît au cours de la lactation (Miettinen, 1991).

Le cholestérol, stérol le plus abondant dans les tissus animaux, est la source de la plupart des stéroïdes. L'effet de l'apport alimentaire sur la cholestérolémie est variable selon les auteurs considèrent la concentration sérique en cholestérol comme l'indicateur des variations alimentaires le plus fiable.

Les AGNE constituent la principale source d'acides gras. Ils proviennent de la mobilisation des graisses de réserves. La lipolyse est activée par l'adrénaline, dont l'effet est potentialisé par l'hormone de croissance en fin de gestation et en début de lactation ; la lipogenèse est stimulée par l'insuline (Jean-Blain, 1995).

CHAPITRE 3

**TECHNIQUES DE COLLECTE
ET D'ANALYSE DE SPERME**

Chapitre 03 : Techniques de collectes et d'analyse du sperme

La collecte du sperme est une phase très importante dans la reproduction et l'insémination artificielle. Plusieurs techniques permettent de réaliser la récolte et toutes permettent d'obtenir une semence de bonne qualité. (Kutzler, 2005 ; Fontbonne *et al.*, 1992). Parmi les méthodes les plus couramment utilisées, de nos jours, on retrouve la récolte au vagin artificiel, l'électro éjaculation (sur animaux vivants) et les techniques de collecte du sperme épидидymaire (sur animaux vivants ou morts).

3.1. Techniques de collecte du sperme épидидymaire

Le prélèvement du sperme de l'épididyme peut être fait sur un animal vivant sous anesthésie avec une intervention chirurgicale. Cette technique consiste à réaliser une microponction du canal déférent et introduire un petit tube qui permet d'avancer à l'extérieur à travers le scrotum et collecter le sperme dans une petite fiole.

Par ailleurs, on peut procéder à la collecte du sperme épидидymaire post-mortem (Zambelli *et al.*, 2006 ; Korochkina *et al.*, 2014). Trois méthodes sont décrites dans la récupération du sperme post mortem :

a. La méthode « cutting-method »

Selon (Kaabi *et al.*, 2003), cette méthode se résume à mettre en oeuvre concrètement plusieurs coupes à l'aide d'une lame sur la partie caudale de l'épididyme. Le fluide spermatique sortant des tubules sera rassemblé.

b. La méthode « float-up »

Le procédé de flottation est une technique simple qui ne nécessite pas beaucoup d'expertise (Gloria *et al.*, 2011). Douze à quinze incisions sont réalisées le long de la queue de l'épididyme et le canal déférent dans une boîte de pétri, lavés avec 2.5 ml de solution alcool chauffée à 37°C et ensuite transférés dans une deuxième boîte de Pétri et lavés encore avec 2.5 ml de la même solution. Le sperme lavé et filtré est recueilli pour un traitement ultérieur.

c. La méthode «retrograde-flushing »

La technique de rinçage rétrograde décrite par (Martinez-Pasteur *et al.*, 2006) exige l'isolement des parties caudales et les canaux déférents du reste de l'épididyme.

La collecte du sperme selon cette méthode peut se faire de deux manières: La première consiste à bloquer, à l'aide d'un forceps, la partie située entre la tête et la queue de l'épididyme, introduire une seringue dans la lumière du canal déférent et injecter, sous pression, 1ml d'un diluant pour semence et, enfin, réaliser une coupure dans la queue de l'épididyme. La semence est récupérée dans un eppendorf et les spermatozoïdes en

suspension sont séparés des débris et placés dans un tube en plastique stérile (Melo et *al.*, 2008). Dans la seconde, une coupure profonde est réalisée, préalablement, dans la queue de l'épididyme, en prenant le soin d'éviter les vaisseaux sanguins, sans bloquer la partie entre la tête et la queue de l'épididyme. Ensuite, on introduit la seringue dans la lumière du canal déférent, on injecte le diluant, sous pression, et on récupère la semence dans un eppendorf (Bruemmer, 2006).

3.2. Évaluation de la qualité du sperme

La meilleure méthode d'évaluation de la fertilité d'un taureau reproducteur est l'estimation du taux de gestation suite à l'insémination de vaches, mais cette méthode est longue et très coûteuse. Ainsi, de nombreuses méthodes macroscopiques et microscopiques ont été développées pour tenter d'évaluer cette fertilité notamment par l'analyse *in vitro* du sperme (Peina Martinez, 2004).

3.2.1. Examens macroscopiques

L'examen visuel du sperme dans le tube de récolte se fait immédiatement après la récolte, cette procédure permet de apprécier le volume, la couleur et la consistance de l'éjaculat.

a. Volume de l'éjaculat

Le volume de semence recueilli varie en fonction de l'âge, de la race, de la préparation du taureau, de l'alimentation et, pour un même taureau, des facteurs psychiques et environnementaux. Il varie entre les valeurs extrêmes de 0,5 à 14 ml avec une moyenne de 4 ml (Parez et Duplan, 1987). Le volume de l'éjaculat est évalué par lecture directe sur le tube de collecte gradué juste après la récolte (Johnston et *al.*, 2001 ; Zambelli, 2006).

b. Couleur et aspect du sperme

La couleur classique du sperme est blanchâtre bien que certains taureaux aient une semence de couleur jaunâtre liée à la teneur en carotène de la ration. La présence d'une odeur anormale peut évoquer une contamination de l'éjaculat par de l'urine, du pus ou des bactéries. Une coloration rosée évoque la présence de sang dans l'échantillon. Une coloration brunâtre est le signe d'une affection du tractus génital engendrant une hémorragie (Johnston et *al.*, 2001).

c. Viscosité du sperme

La viscosité est corrélée à la concentration en spermatozoïdes, en effet l'éjaculat est d'autant plus visqueux que le nombre de spermatozoïdes est élevé. Le sperme a généralement une consistance « laiteuse » à « crémeuse » (Parez et Duplan, 1987).

Tableau 3 : Classement du sperme en fonction de l'examen macroscopique
Recommandations de la société de Theriogenology (Elmore, 1985).

Couleur	Turbidité	Consistance et viscosité	Concentration prévue en spermatozoïdes par ml	Qualité attribuée au sperme
Blanc	Opaque	Crémeuse et visqueuse	750 millions à 2 milliards	Très bonne
Blanc	Opaque	Faiblement visqueuse	400 à 750 millions	Bonne
Blanc sale	L'égerment translucide	Laiteuse	250 à 400 million	Assez bonne à moyenne
Grisâtre	Translucide	Aqueuse	Inférieure à 200 million	Mauvaise

3.2.2. Examens microscopiques

Ils comportent l'évaluation de la concentration en spermatozoïdes, du pourcentage en spermatozoïdes vivants, de l'intégrité membranaire, de la morphologie des spermatozoïdes et de la motilité (l'évaluation de la motilité a été traitée séparément)

a. Concentration du sperme

On peut déterminer la concentration par comptage direct des spermatozoïdes en utilisant des hématimètres, l'utilisation de la densité optique, l'utilisation de compteur électronique, la détermination du volume cellulaire par centrifugation ... etc.

On détermine la concentration en spermatozoïdes dilués dans du NaCl 3%, à l'aide de la cellule de THOMA, par la formule suivante : $C = N \times 4 \times 10 \times d$, avec :

- N : le nombre de spermatozoïdes (spermatozoïde) dans quatre grandes carrées de la cellule de THOMA ;
- C : la concentration en spermatozoïdes du sperme ;
- x4 : puisque la cellule contient 16 carrées ;
- x10 : profondeur de la chambre ;
- d : l'inverse du taux de dilution.

Le bon sperme a une concentration supérieure à 0,5.10⁹ spermatozoïdes/ml (Kabera, 2008).

b. Pourcentage de spermatozoïdes vivants

Le pourcentage de spermatozoïdes vivants est apprécié de façon approximative, au microscope optique ; cet examen s'effectue de manière plus aisée sur frottis coloré à l'éosinenigrosine. En effet, les spermatozoïdes dont la membrane est endommagée laissent pénétrer le colorant et apparaissent donc roses (éosine) sur fond bleu (nigrosine) alors que les spermatozoïdes vivants ont une membrane intacte et apparaissent donc incolores (Kabera, 2008). Un bon sperme doit avoir au moins 60 à 70 % de spermatozoïdes vivants. Si le taux de spermatozoïdes vivants est inférieur à 60%, la semence n'est pas conservée.

c. Test hypo- Osmotique

L'intégrité membranaire est indispensable à la fécondation car la membrane plasmique intervient dans la réaction acrosomique et l'attachement des gamètes (Jeyendran, 1984). L'intégrité de la membrane plasmique des spermatozoïdes est d'une importance extrême en raison de son rôle dans l'interaction avec le tractus génital femelle, le cumulus de l'ovocyte et pour la fusion avec l'ooplasm (Rodriguez, 2003).

Le test hypo-osmotique ou HOST permet d'évaluer cette intégrité membranaire des cellules. Dans des conditions hypo-osmotiques, la cellule va permettre l'entrée de molécules d'eau à travers sa membrane plasmique, ce flux d'eau entraîne une augmentation du volume intracellulaire (Jeyendran, 1984).

Le phénomène est particulièrement visible au niveau de la queue des spermatozoïdes (Jeyendran, 1984). Le test hypo-osmotique vise à mettre en évidence les propriétés physiques de la membrane plasmique.

Pour réaliser ce test, la semence est mélangée à une solution hypotonique dont la composition et l'osmolarité sont déterminées pour le taureau. Le mélange est incubé à 37°C, puis les spermatozoïdes sont observés au microscope à contraste de phase.

Les spermatozoïdes dont la membrane est intègre se déforment, ils se reconnaissent à leur flagelle qui se recourbe ou s'enroule. Selon la forme qu'ils prennent, ils sont classés en sept catégories de « a » à « g » selon le schéma ci-dessous :

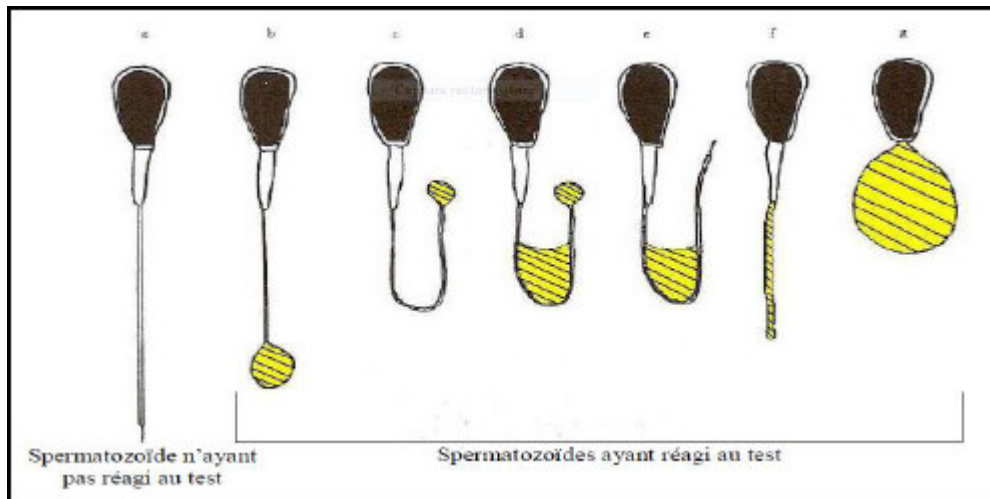


Figure 7 : Modifications morphologiques des spermatozoïdes soumis au test hypo-osmotique
D'après (Jeyendran, 1984).

Le nombre de spermatozoïdes qui réagissent positivement au test, c'est-à-dire ceux dont la membrane plasmique est intacte, est inversement proportionnel au nombre de spermatozoïdes ayant une membrane plasmique endommagée. Il faut noter que ce test permet d'évaluer une des caractéristiques des spermatozoïdes, l'intégrité membranaire, mais il ne permet pas de corrélation avec la morphologie ou la vitalité des spermatozoïdes.

d. Morphologie des spermatozoïdes

En pratique, l'examen morphologique des spermatozoïdes, consiste en l'observation au microscope optique d'un étalement de semence coloré à l'éosine-nigrosine (le plus souvent) ou au Giemsa, à l'encre de Chine ou au rose Bengale. Le frottis est coloré de la même manière que pour l'examen de la vitalité (Morrow, 1986).

En insémination artificielle, le sperme destiné à la congélation doit contenir moins de 20 à 25% des spermatozoïdes anormaux et plus de 60% de spermatozoïdes vivants (Kabera,2008).

3.3. Évaluation de la mobilité spermatique

La motilité est une mesure des mouvements de spermatozoïde. Sa liaison avec la fécondance du sperme tiendrait au fait qu'une bonne motilité traduit une membrane intacte et fonctionnelle.

3.3.1. Évaluation subjective de la motilité

a. Motilité massale

La motilité massale est évaluée après la collecte du sperme immédiatement et l'éjaculat est maintenu à une température de 37°C. Elle est estimée au microscope à contraste de phase au grandissement x100 : une microgoutte de sperme est déposée sur une lame et le mouvement global des spermatozoïdes est apprécié en fonction de l'intensité des vagues observables. Une note de 0 à 5 est attribuée à l'échantillon observé. Lors de cet examen, on note les turbulences engendrées par la conjugaison des mouvements issus de tous les spermatozoïdes présents dans la goutte de semence observée. Les critères de notation de la motilité massale de la semence dans l'espèce bovine est comme suit

Tableau 4 : Note d'appréciation subjective de la mobilité massale des spermatozoïdes dans un échantillon d'après : Fontbonne, (1992).

Note	Interprétation
0	Pas de mouvement
1	Spermatozoïdes en mouvement mais pas de mouvement d'ensemble
2	Ebauche de mouvement d'ensemble circulaire
3	Mouvements d'ensemble : cercles centres sur eux-mêmes
4	Mouvement d'ensemble : vagues rondes en mouvement
5	Mouvements d'ensemble intensifiés

b. Motilité individuelle

L'évaluation de la motilité individuelle des spermatozoïdes est complémentaire de la note de motilité massale. Cet examen vise à évaluer le pourcentage de spermatozoïdes motiles (Dumont, 1997). Pour cet examen, le sperme est dilué 1/10 de sérum physiologique à fort grandissement (x 400) (Kabera, 2008). Une goutte de cette solution est placée entre lame et lamelle en éclairage contrasté. On note le pourcentage des spermatozoïdes présentant une trajectoire quasi rectiligne et capables de traverser le champ en 2 à 3 secondes. Certains spermatozoïdes présentent des mouvements rotatoires circulaires ou des mouvements d'amplitude très réduite, ils ne sont donc pas comptabilisés dans les spermatozoïdes mobiles. (Parez et al, 1987).

3.3.2. Évaluation objective de la motilité

Les examens cités précédemment sont par nature des examens subjectifs, on déplore une certaine variabilité intra et inter-opérateurs. Cette variabilité de l'évaluation des paramètres spermatiques peut avoir des répercussions sur la décision d'utilisation ou de rejet de l'éjaculat et dans le cadre d'échanges commerciaux entre laboratoires ou entre pays. Pour une meilleure précision et objectivité de résultat, le système CASA (*Computer-Assisted Semen Analysis*), est le premier proposé par DOTT et FOSTER depuis des années (Iguer-Ouada, Verstegen, 2001). Il permet d'analyser de nombreux paramètres (tels que la concentration, la motilité, la vitesse et la morphologie du spermatozoïde) sur un grand nombre de spermatozoïdes avec une grande répétabilité.

Ces appareils ont été mis au point initialement pour un usage en médecine humaine, par la suite ils ont été paramétrés de façon à être utilisables dans différentes espèces animales (dont les espèces bovine, canine, équine et porcine) (Palmer et al., 2003).

La comparaison entre les méthodes conventionnelles et l'analyse assistée par ordinateur a été effectuée pour l'examen morphologique du sperme (Marnet et al., 2000) et l'évaluation de la mobilité des spermatozoïdes (Walker et al., 1982). La variation intra opérateur est beaucoup plus élevée pour les méthodes conventionnelles d'examen de la morphologie que pour la méthode assistée par ordinateur (coefficient de variation = 0,43 pour les méthodes conventionnelles contre 0,08 pour l'analyse assistée par ordinateur) (Marnet et al., 2000). Aussi cette étude a conclu que l'analyse morphologique assistée par ordinateur présente une valeur prédictive légèrement supérieure aux techniques conventionnelles mais surtout une reproductibilité bien supérieure, permettant la standardisation (Walker et al., 1982). Les appareils de ce type fonctionnent grâce à une caméra couplée à un microscope et utilisent un logiciel informatique permettant de transformer le signal électrique transmis par la caméra et l'analyse des trajectoires des spermatozoïdes, ils fournissent des données intéressantes sur le mouvement des spermatozoïdes et cela permet une mesure plus fine puisqu'il est possible, avec cette méthode, d'identifier chaque spermatozoïde et de suivre son déplacement. Plusieurs paramètres de cinétique des spermatozoïdes peuvent alors être calculés :

- La vitesse curviligne ou (VCL) (Curvilinear Velocity) qui reflète la distance totale que couvre la tête du spermatozoïde au cours de la période d'observation.
- La vitesse moyenne de trajectoire ou VAP (Average Path Velocity) correspond à la distance parcourue sur le trajet moyen pendant la durée d'observation.

- La vitesse linéaire ou VSL (Straight-Line Velocity) est déterminée par la mesure de la distance entre le point d'arrivée et le point de départ, en ligne droite.
- ALH (Amplitude of Lateral Head displacement) correspond à l'amplitude de déplacement latéral de la tête.
- La fréquence de battement de tête ou BCF (beat cross frequency) est la fréquence à laquelle la tête du spermatozoïde traverse la trajectoire moyenne, elle est mesurée en Hertz.
- Larectitude (STR) qui est la valeur moyenne du rapport VSL/VAP en pourcentage (Cette rectitude estime la proximité de la voie de la cellule à une ligne 100% correspondant à la rectitude optimale),
- La linéarité (LIN) qui est la valeur moyenne du rapport VSL/VCL en pourcentage (la linéarité estime la proximité de la trajectoire de la cellule à une ligne droite).

Ces paramètres CASA ont été raffiné mathématiquement afin de décrire les paramètres de mouvement de chaque spermatozoïde qui se déplace à travers un champ microscopique (Boyer et al, 1989).

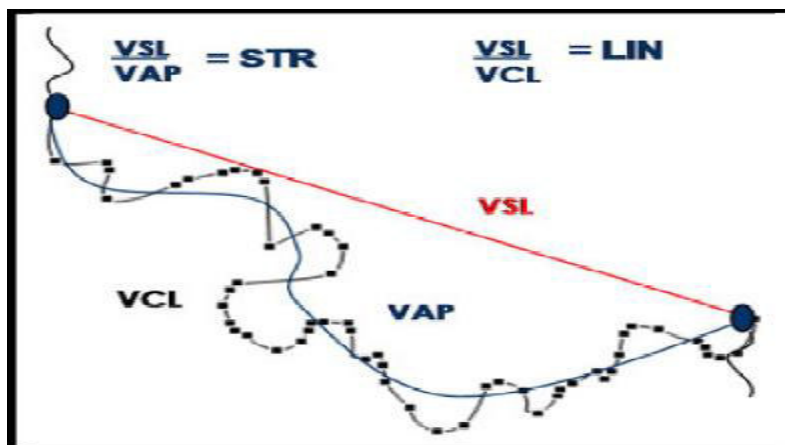


Figure 8 : Représentation schématique des différentes vitesses mesurées par CASA.

VSL : vitesse linéaire, VCL trajectoire, STR : la rectitude, LIN : vitesse curviligne, VAP : vitesse moyenne de la : linéarité (Source : www.casa-scopus.com).

CHAPITRE 4

LE STRESS OXYDATIF

Chapitre 4 : Le stress oxydatif

4.1. Le stress oxydatif

Le stress oxydatif est un déséquilibre dans la balance métabolique cellulaire durant lequel il y a production des molécules appelées radicaux libres (Sorg, 2004).

Ces molécules sont composées d'oxygène et comportent soit des électrons non appariés dans la couche de valence, soit une liaison instable entre deux atomes, ce qui les rend relativement réactives et leur confère un pouvoir oxydant (Boss, 2002). Ils retrouveront leur stabilité en participant à des réactions chimiques dont la conséquence est l'engendrement de dommages importants sur la structure et le métabolisme cellulaire, en dégradant de nombreuses cibles : protéines, lipides et acide nucléiques avant d'être neutralisées (Tremellen, 2008).

4.1.1. Principaux radicaux libres

Les radicaux libres étant des molécules instables, elles forment une cascade de réactions qui s'enchainent les unes après les autres, générant à chaque fois de nouveaux radicaux libres. Les plus fréquemment rencontrés sont : l'anion super-oxyde, le peroxyde d'hydrogène, et le radical hydroxyle.

A. **L'anion super-oxyde ($O_2^{\bullet-}$)**: issu par ajout d'un électron à une molécule de dioxygène. Il est considéré comme relativement peu toxique à cause de sa courte durée de vie (milliseconde) et de son faible pouvoir oxydant.

B. **Le peroxyde d'hydrogène ($H_2 O_2$)**: généré lors de la dismutation spontanée ou enzymatique d' O_2^- . Il est plus toxique dû à sa stabilité et sa puissance oxydative.

C. **Le radical hydroxyle (OH^{\bullet})** : formé lors de la réduction de $H_2 O_2$ en présence d'ion ferreux (Fe^{2+}) (réaction de Fenton) ou par la réaction $H_2 O_2 + O_2^{\bullet-}$ en présence d'ions ferriques (Fe^{3+}) (réaction d'Haber-Weiss).

Le radical OH^{\bullet} est extrêmement réactif et possède une demi-vie très courte (Chauhan et Chauhan, 2006).

4.1.2. Mécanismes et sources de production des radicaux libres

Différents éléments peuvent générer et produire les radicaux libres en excès ; cette production peut être d'origine liée à des facteurs exogènes, comme elle peut avoir une origine endogène pendant le métabolisme normal.

a. Principales sources exogènes

- Rayonnement électromagnétique (radioactivité, radiations ionisantes, lumière ultraviolette : UVA et UVB).
- Métaux toxiques : Cadmium, plomb, mercure.

- Fumées de combustion (cigarette, bois, matériaux de construction), oxyde de carbone.
- Produits chimiques (intervention du cytochrome P450) : antiseptiques, médicaments, pesticides.
- Solvants (benzène), détergents, trichloréthylène.
- Poussières (d'amiante, de silice).
- Alcool ... (Young et Woodside, 2001).

b. Principales sources endogènes

- Chaîne mitochondriale de transport d'électrons :

La réduction de l'O₂ moléculaire par la chaîne mitochondriale de transport d'électrons est nécessaire à la production de l'énergie biologique, quatre complexes mitochondriaux (I-IV) sont impliqués (Beckman et Ames, 1998 ; Kevin et *al.*, 2005). Cependant la réduction reste incomplète ; 1% à 4% d'oxygène fuit la chaîne de transport d'électrons sous la forme d'O₂

- Ce dernier est produit au niveau du complexe I et du complexe III, et la majeure partie de l'O₂ - est converti par le super-oxyde dismutase à manganèse (Mn-SOD) dans la matrice mitochondriale en H₂ O₂ qui diffuse facilement à travers les membranes mitochondriales. Le reste quitte la mitochondrie via les canaux anioniques de la membrane mitochondriale et est rapidement converti en H₂ O₂ dans le cytoplasme, soit spontanément, soit par le super-oxyde dismutase à cuivre (Cu-SOD). Par ailleurs, le H₂ O₂ réagit avec les métaux de transition particulièrement Fe²⁺ (réaction de Fenton) pour former le radical hydroxyle (OH.) (Kevin et *al.*, 2005).

- Cellules immunitaires

Les macrophages et neutrophiles activées, peuvent produire de grandes quantités d'O₂- et de ses dérivés via les iso-formes de la NADPH oxydase phagocytaire. La production massive des radicaux libres antimicrobiens et anti-tumoraux dans un environnement inflammatoire joue un rôle important de première ligne de défense contre les agents pathogènes (Wulf, 2002). La stimulation des neutrophiles et des macrophages génère également l'oxygène singulet par des réactions qui impliquent la NADPH oxydase (Steinbeck et *al.*, 1993).

- Xanthine oxydase :

La production des radicaux libres par la xanthine oxydase est considérée comme la principale source du stress oxydant dans certaines conditions pathologiques (Wulf, 2002). La xanthine oxydoréductase (XOR) est largement distribuée dans l'organisme surtout au niveau

de la partie apicale de la membrane des cellules mammaires et des cellules épithéliales intestinales.

4.2. Dommages irréversibles des radicaux libres sur les spermatozoïdes

Malgré que les radicaux libres soient des acteurs indispensables de la maturation spermatique et sa capacitation, leur haute réactivité peut les rendre nocives pour eux. L'ensemble de ces dommages oxydant sur les différents composants des spermatozoïdes peut potentiellement provoquer une perte de fonction des spermatozoïdes (Noblanc, 2013).

a. La peroxydation lipidique des spermatozoïdes

Les lipides membranaires sont la première cible des radicaux libres lors du phénomène de la peroxydation lipidique et plus particulièrement les acides gras polyinsaturés qui sont facilement oxydables (Koechlin, 2006).

Les spermatozoïdes sont particulièrement sensibles à la peroxydation lipidique car leur membrane est enrichie en acides gras polyinsaturés et en stérols, surtout après leur maturation durant le trajet dans l'épididyme, cette peroxydation augmente la rigidité de la membrane spermatique et entraîne rapidement une perte de la mobilité selon Gomez *et al.* (1998) cité par Noblanc. (2013), elle est initiée par le radical hydroxyle, l'oxygène singulet et le peroxonitrique .

b. La peroxydation protéique des spermatozoïdes

Les radicaux libres peuvent endommager les protéines et les rendre moins actives, et non fonctionnelles. Les chaînes latérales des acides aminés composant les spermatozoïdes peuvent réagir avec le radical OH•, il en résulte la formation de groupement carbonyles, la protéine devienne alors sous forme d'un radical libre (Chevion *et al.*, 2000 ; Dalle Donne *et al.*, 2006).

c. La peroxydation de l'ADN des spermatozoïdes

Bien que l'ADN soit la mémoire de toute la composition biochimique des êtres vivants, il s'agit d'une molécule très sensible à l'attaque par les radicaux de l'oxygène (Cadet *et al.*, 2002). Le stress oxydatif est capable d'endommager l'ADN spermatique. Il s'agit d'ailleurs d'un point crucial en termes de fertilité selon Jena (2012) cité par Noblanc (2013). Selon Sawyer *et al.* (2003) cité par Noblanc. (2013), ces effets nocifs peuvent se produire à la fois sur l'ADN du noyau spermatique et sur l'ADN mitochondrial. L'ensemble des dommages à l'ADN spermatique ne pourra pas être réparé par le spermatozoïde lui-même car son ADN très compacté est inaccessible, C'est uniquement lors de la fécondation que l'ovocyte prendra en charge la réparation de ces dommages.

4.3. Les systèmes de régulation des radicaux libres protégeant les spermatozoïdes

Il apparaît évident que la concentration en radicaux libres doit être finement régulée tout au long du transit des gamètes du testicule jusqu'à l'ovocyte dans le tractus génital femelle. Cette régulation est réalisée par différentes molécules dites « anti-oxydantes » (Noblanc, 2013).

4.3.1. Définition et catégories des antioxydants

Les antioxydants sont de petites molécules pouvant récupérer les radicaux libres, en donnant ou en recevant un électron. Leurs actions peuvent être enzymatiques ou nonenzymatiques (Sies, 1997).

a. Les antioxydants enzymatiques

Les antioxydants enzymatiques se retrouvent sous forme d'enzymes produites par l'organisme (Baba et McGrath, 2008) et ils sont considérés comme la première ligne de défense de notre organisme contre les radicaux libres (Chavan et Melinkeri, 2013). On en compte trois principales enzymes, toutes les trois présentes dans le cytoplasme, le milieu extracellulaire et la mitochondrie et elles jouent un rôle très important dans le maintien de la santé (Baba et McGrath, 2008).

- Le super-oxyde dismutase (SOD)

C'est l'enzyme la plus importante dans la défense contre le stress oxydatif (Buldak et al., 2014), elle catalyse la dismutation de l' O_2^- en H_2O_2 .

- La catalase (CAT)

Un tétramère composé de quatre chaînes de polypeptides, se retrouve dans la presque totalité des organismes aérobies (Chelikani et al., 2004). Son rôle principal est de catalyser la dégradation de l' H_2O_2 produit par la dismutation de l' O_2^- en eau et oxygène (Luck, 1954).

- La glutathion réductase (GR)

C'est l'antioxydant endogène principal du corps humain ; son rôle est de catalyser la réduction du H_2O_2 en eau et la réduction des hydro-péroxydes organiques (ROOH) en alcools (Rodrigo, 2009).

b. Les antioxydants non enzymatiques les plus étudiés

Contrairement aux antioxydants endogènes, la plupart des antioxydants exogènes non enzymatiques ne sont pas synthétisés par l'organisme et doivent être apportés par l'alimentation. Dans cette catégorie, nous retrouvons :

- La vitamine E

Selon Noblanc. (2013), les travaux ont montré que le traitement de l'asthénozoospermie avec de la vitamine E conduit à une diminution de la peroxydation lipidique des spermatozoïdes, et une augmentation de la mobilité spermatique. *In vitro*, selon Lombardo *et al.* (2011) cité par Noblanc. (2013), la cryopréservation du sperme en présence de vitamine E préserve mieux la mobilité des spermatozoïdes qu'en absence de vitamine E.

- Vitamine C ou Acide ascorbique

La vitamine C ou acide ascorbique est un antioxydant majeur et excellent donneur d'électrons, il piège les radicaux libres dont OH• et les radicaux lipidiques peroxy (LOO•). Les éjaculats avec de mauvais paramètres spermatiques et associés à un stress oxydant contiennent une concentration significativement plus faible d'acide ascorbique (Agarwal *et al.*, 2012).

4.4. Évaluation du stress oxydatif des spermatozoïdes

L'évaluation de l'état oxydatif des spermatozoïdes se fait par la mesure d'un groupe de marqueurs formés par l'oxydation de biomolécules reflétant ainsi des modifications au niveau des tissus qui sont exposés aux oxydants. De plus, dans certains cas ces bio-marqueurs renseignent sur le lieu du stress oxydatif. (Kohen et Nyska, 2002).

4.4.1. Évaluation de la peroxydation lipidique membranaire des spermatozoïdes par le test TBARS

La peroxydation lipidique des spermatozoïdes est évaluée par la mesure de la concentration en produits de la peroxydation lipidique, tels que le Malon-dialdéhyde (MDA), qui réagissent avec l'acide Thio-barbiturique pour former un composé fluorescent (Favier, 1997). Le test TBARS repose sur la formation d'un complexe coloré rose résultant de la réaction entre une molécule de MDA et deux molécules d'acide 2- Thio-barbituriques. L'évaluation de la peroxydation lipidique est suivie par le spectrophotomètre à 532 nm. (Noblanc, 2013).

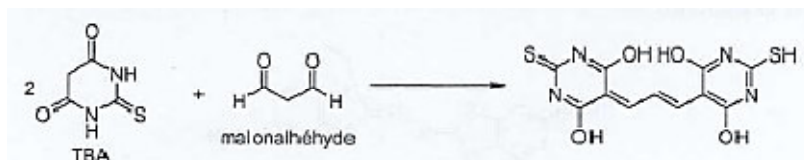


Figure 9 : Dimérisation de l'acide Thio-barbiturique (Meunier, 2002)

4.5. Évaluation de l'activité anti-oxydante des spermatozoïdes

4.5.1. Évaluation par l'ABTS

A la mort cellulaire de l'ADN, des anticorps anti-ADN réagissent avec l'ADN nucléosomique due à l'apoptose, l'ABTS dans ce cas joue le rôle d'un radical libre : une réaction colorimétrique se développe entre l'ABTS et la peroxydase portée par les Anticorps anti-ADN. La quantité d'ABTS oxydé correspondant à la quantité d'ADN fragmenté est mesurée à 405 nm au lecteur de plaque ELISA. (D'après Mouret et al. (2007) cité par Nzungue (2008).

4.5.2. Dosage de l'activité de la catalase

Selon Aebi (1974) et Goth (1991), le dosage de l'activité de la catalase consiste à mesurer la disparition de H_2O_2 induite par la catalase contenue dans l'échantillon en mesurant l'absorbance de H_2O_2 à 240 nm. En conséquence, l'activité de la catalase décroît en même temps que la concentration en H_2O_2 décroît au fur et à mesure de sa consommation par l'enzyme.

4.6. Test à l'hémoglobine

Plusieurs techniques sont utilisées pour évaluer le stress oxydatif des spermatozoïdes et leur activité antioxydante *in vitro*, ces techniques sont basées sur l'emploi de réactifs chimiques synthétiques (TBARS, ABTS, DPPH, ... etc.). Il existe peu de tests *in vitro* basés sur des biomolécules. L'utilisation de l'hémoglobine est un nouveau test pour l'évaluer, il permet d'avoir une idée globale à la fois sur le stress oxydatif et sur l'activité anti-oxydante.

Ce test consiste à co-incuber l'échantillon avec de l'hémoglobine frais à température ambiante pendant 30 mn, puis le stress oxydatif est induit en ajoutant le peroxyde d'hydrogène à une concentration finale de 50 mM pour oxyder l'hémoglobine.

La capacité de l'échantillon à protéger l'hémoglobine contre H_2O_2 est révélée par la mesure de l'absorbance par spectrophotométrie à 412 nm et sa comparaison à un témoin dit positif ne comportant pas l'échantillon. La diminution de l'intensité à 412 nm représente le degré de dénaturation de l'hémoglobine par le radical H_2O_2 (Bellik, 2014).

PARTIE EXPERIMENTALE

CHAPITRE 1

MATERIELS ET METHODES

Chapitre 1 : Matériel et méthodes

1.1. Matériel

1.1.1. Matériel biologiques

Notre présente étude a été effectuée, sur les matrices de onze femelles bovines (vaches et génisses) âgées de 12.5 à 45 mois de note d'états corporels entre 1.5 à 4 récupérées au niveau de quelques tueries et abattoirs de la wilaya de Bejaia : de Souk-El-Tenine, de kherrata, de chemini et d'El-Kseur.

a. Les matrices

Les matrices des vaches ont été récupérées juste après abattage et ont été transportées dans une glacière au laboratoire pour collecter le liquide folliculaire et les cellules oviductales.



Figure 10 : Matrice d'une vache récupérée après abattage (originale).

b. Les testicules

Les testicules des taureaux ont été récupérés de l'abattoir de Bejaïa tôt le matin juste après abattage puis transportés, à température ambiante au laboratoire pour la collecte de la semence.



Figure 11 : Testicule d'un taureau récupéré juste après l'abattage (Originale)

c. Hémoglobine

Pour le test à hémoglobine (obtenue après éclatement des globules rouges par l'eau distillée)

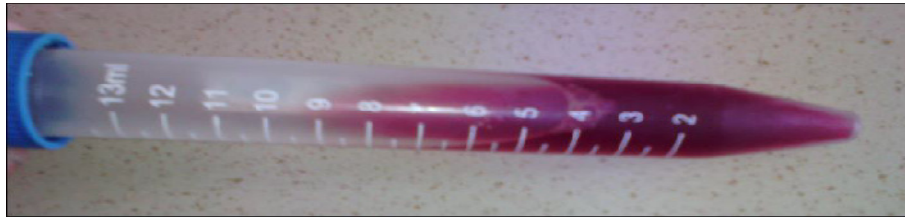


Figure 12 : Hémoglobine de la vache (Originale)

1.1.2. Matériels de laboratoire

a. Système CASA pour le test de mobilité des spermatozoïdes

Les paramètres spermatiques ont été analysés par l'analyseur informatique (Sperme class Analyzer) (SCA Version 5.4, microptic S.L. Viladomat 321, 6 – 4 08029 – Barcelona, Spain). Cet outil sert à réaliser une analyse automatique des vidéos de spermatozoïdes en mouvement et de générer des valeurs objectives telles que la vitesse de progression des spermatozoïdes et la mobilité totale. Ce système comporte un microscope lié à une caméra digitale, le tout est associé à un ordinateur doté d'un logiciel d'analyse.



Figure 13 : analyseur informatique de marque SCA utilisé pour mesurer les caractéristiques du mouvement des spermatozoïdes (Originale).

b. Spectrophotomètre d'absorption

Utilisé pour déterminer et suivre l'évolution dans le temps de l'absorbance de l'hémoglobine dans l'étude du statut oxydatif des spermatozoïdes (test à l'hémoglobine).



Figure 14 : Spectrophotomètre visible VIS – 7220 G (Originale).

c. Sonicateur

Utilisé pour endommager la membrane plasmique des spermatozoïdes pour faire sortir le contenu cellulaire.



Figure 15 : Sonicateur VCX 130 (130 watts)

d. Centrifugeuse



Figure 16: centrifugeuse de marque Sigma

1.1.3. Produits chimiques

La solution physiologique (0,9% NaCl) ; le H_2O_2 ; NaH_2PO_4 ; Na_2HPO_4 et eau distillée.

1.2. Méthode

1.2.1. Préparation des échantillons

1.2.1.1. Échantillons prélevés des matrices

Une fois arrivées au laboratoire, les matrices ont été nettoyées à l'aide de la solution physiologique et séchées à l'aide du papier absorbant.

a. Liquides folliculaires

Les liquides folliculaires ont été prélevés à partir des follicules apparents sur la surface de l'ovaire à l'aide d'une seringue de 5 ml par aspiration du contenu dans des eppendorf étiquetés qui sont conservées à -4°C jusqu'à utilisation (Figure 17)

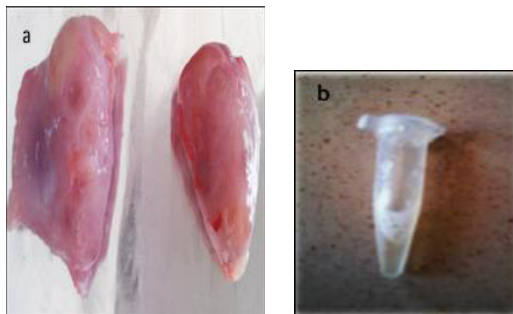


Figure 17: Figure représentant deux ovaires d'une vache (a) et le liquide folliculaire aspiré à partir de ces deux ovaires (b) (Originale).

b. Cellule oviductales

La collecte des cellules oviductales est réalisée comme suit :

- Les oviductes ont été isolés des matrices, nettoyés du tissu conjonctif en excès et les cellules oviductales ont été prélevées par flashage du tube oviductal à l'aide d'une seringue de 5 ml contenant 1 ml de solution physiologique (0,9% de NaCl) et de l'air. Les cellules oviductales sont récupérées dans un eppendorf et sont conservées à -4°C .



Figure 18 : Prélèvement des cellules oviductales (Originale).

1.2.1.2. Prélèvement du sperme épидидymaire des testicules

Le sperme épидидymaire a été collecté sur les testicules récupéré après abattage des taureaux. Le contenu de la région caudal est récupéré à l'aide de la méthode de rinçage rétrograde « Retrograde-flushing » en suivant les étapes suivantes :

a- Dissection de l'épididyme

La dissection de l'épididyme est réalisée comme suite :

- Les tissus qui enveloppent le testicule et l'épididyme ont été enlevés à l'aide d'une lame de rasoir. (figure 19).



Figure 19 : Testicule après l'avoir dépourvu de la tunique vaginale (Originale).

- l'épididyme et le canal déférent ont été, ensuite, complètement isolés du testicule et ont été rincés avec la solution physiologique (0,9% NaCl) et séchés avec du papier absorbant.

(Figure 20).



Figure 20 : Epididyme et canal déférent isolés du testicule (Originale).

- le canal déférent est nettoyé des tissus en excès et vaisseaux sanguins pour éviter toute contamination de la semence avec le sang.

b - Récolte de la semence

La semence est récoltée avec la méthode « retrograde-flushing » : l'aiguille d'une seringue contenant 1 ml de la solution physiologique et remplie d'air (Figure 21-a), a été introduite dans la lumière du canal déférent.

Une incision a été, ensuite, réalisée au niveau de la queue de l'épididyme à l'aide d'une lame de rasoir (figure 21-b) et un tube gradué (eppendorf) est placé juste où l'incision afin de récolter la semence (figure 21-c). La figure 21-d représente le sperme épидидymaire pur, fraîchement collecté.



Figure 21 : La technique de rinçage rétrograde « retrograde-flushing » décrite par Martinez -Pasteur et *al.* (2006) (Originale).

1.3. Protocole expérimental

1.3.1. Dilution du sperme

Le milieu de dilution utilisé est la solution physiologique (0,9% de Na Cl). Le sperme collecté a été pré-dilué à 1 :10 (soit 1 ml de semence fraîche dans 9 ml de solution physiologique) pour obtenir une concentration d'environ 200 millions de spermatozoïdes /ml. Ce volume de sperme pré-dilué a été divisé en deux : la grande partie est réservée à l'étude du statut oxydatif des spermatozoïdes (pour obtenir une concentration finale après co-incubation avec les liquides folliculaire ou oviductal de 100 millions de spermatozoïdes/ml). La seconde partie a été diluée 1 :2 (pour obtenir une concentration finale après co-incubation avec les liquides folliculaire ou oviductal de 50 millions de spermatozoïdes/ml) pour l'étude de la mobilité spermatique.

1.3.2. Dilution des échantillons de liquide folliculaire et de cellules oviductales

Les échantillons de liquides folliculaires (8) et de cellules oviductales (8) ont été dilués à 2 : 5 (pour obtenir une concentration finale en ces liquides de 20% après co-incubation avec le sperme).

1.3.3. Co-incubation des échantillons avec le sperme

1.3.3.1. Pour l'étude de la mobilité

Le sperme dilué a été ajouté aux échantillons de cellules oviductales et de liquides folliculaires préalablement dilués avec un taux de 1 :2 (V/V) pour avoir des concentrations finales de 50 millions de spermatozoïdes /ml et de 20% de liquides au niveau de chaque tube.

Le mélange a été incubé à température ambiante pendant 10 min et la mobilité des spermatozoïdes a été analysée par le CASA à T0 (10 min après le mélange initial) puis à chaque une heure jusqu'à 6 heures (T1 à T6).

Brièvement, une goutte de 10µl du témoin (sperme dilué seul) ou du traitement (sperme co-incubé avec les cellules oviductales ou le liquide folliculaire) est déposée sur la chambre de comptage de Makler. Cette dernière a été couverte par sa lamelle spéciale et mise sous microscope à contraste de phase avec un grossissement de 10. Trois champs différents ont été captés, analysés et enregistrés pour chaque échantillon.

Pour chaque spermatozoïde mobile, 8 paramètres ont été enregistrés par le CASA : la vitesse curvilinéaire en µm/s (VCL), la vitesse de progression linéaire en µm/s (VSL), la vitesse selon la trajectoire moyenne µm/s (VAP), l'amplitude de déplacement latéral de la tête en µm (ALH), la fréquence de croisement de la trajectoire en Hz (BCF), la linéarité en % (LIN = VSL/VCL), la rectitude ou straightness en % (STR = VSL/VAP) et l'oscillation ou wobble en % (WOB = VAP/VCL).

1.3.3.2. Pour le test à l'hémoglobine

Le sperme pré-dilué a été ajouté aux échantillons de de cellules oviductales et de liquides folliculaires préalablement dilués avec un taux de 1 :2 (V/V) pour avoir des concentrations finales de 100 millions de spermatozoïdes /ml et de 20% de liquides au niveau de chaque tube.

Après une co-incubation de 4 heures à température ambiante, les échantillons ont été centrifugés (800 x g ; 10 mn) et les surnageants (contenant le liquide folliculaire/ les cellules oviductales et le diluant) ont été éliminés.

Pour chaque tube contenant le culot (cellules spermatiques), 1500 µl d'eau distillée ont été ajoutés. Les culots ainsi dilués ont été soumis deux cycles de sonication (traitement par ultrasons) de 40 s espacés par 40 s de repos suivis d'une centrifugation (6000 x g ; 15 min) pour éliminer les débris cellulaires (culots) et garder les contenus des cellules spermatiques (surnageants) qui sont conservés à une température de -25° C jusqu'au moment d'utilisation.

Décongélation des surnageants et incubation avec l'hémoglobine

Après décongélation des surnageants renfermant les contenus des cellules spermatiques, 100 µl de ces surnageants ont été co-incubés avec 100 µl de l'hémoglobine pendant 30 min au bout desquels 4900 µl de l'eau distillée ont été ajoutés afin de diluer l'hémoglobine et 800 µl de H₂O₂ (à une concentration finale de 50 mM) ont été additionnés pour initier et provoquer un stress oxydatif. Immédiatement après, l'absorbance à 412 nm (longueur d'onde d'absorption de l'hémoglobine) a été lue (à T0 à T6, T16 et T21 h) pour chaque échantillon après élimination de l'absorbance du blanc (préparé en même temps que de l'échantillon), contenant tous les réactifs et produits (surnageant, eau distillée et H₂O₂) sauf l'hémoglobine.

Afin de vérifier un éventuel effet (anti ou pro oxydant) des surnageants sur l'hémoglobine, deux témoins (négatif : contenant de l'hémoglobine diluée uniquement sans initialisateur du stress oxydatif H₂O₂ ; et positif contenant l'hémoglobine diluée et H₂O₂) ont été ajoutés.

Résumé des composantes du test :

- Témoin positif oxydé par le H₂O₂ (100 µl d'HG + 800µl de H₂O₂ + 5000 µl d'eau distillée) (Blanc du témoin + : 800µl de H₂O₂ + 5100 µl d'eau)
- Témoin négatif non oxydé par le H₂O₂ (100 µl d'HG + 5800 µl d'eau) (Blanc du témoin négatif : (5900 eau distillée)
- Témoin oxydé par le H₂O₂ (100 µl surnageant + 100 µl d'HG + 4900 µl d'eau + 800 µl de H₂O₂) (Blanc du témoin: 100 µl de surnageant + 800µl de H₂O₂ + 5000 µl d'eau distillée).
- Échantillons : (100 µl surnageant + 100 µl d'HG) + 4900 µl eau distillée + 800 µl de H₂O₂ (Blanc de l'échantillon : 100 µl de surnageant + 800µl de H₂O₂ + 5000 µl d'eau distillée).

1.4. Analyses statistiques

Toutes les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du logiciel Microsoft R open version 3.2.3.

Les données fournies par le CASA ont été importées dans un fichier unique. D'un part, la totalité des données ont été utilisées pour étudier la variation du % de spermatozoïdes mobiles (la mobilité totale) en fonction du BCS par analyse de la variance.

Par ailleurs, les données concernant les spermatozoïdes mobiles ont été traitées par des analyses multidimensionnelles afin de caractériser les sous-populations de spermatozoïdes en fonction des caractéristiques de leur mouvement.

Préalablement à l'application des méthodes multidimensionnelles, les paramètres spermatiques ont été transformés et standardisés en vue de normaliser leur variance. Les données ont subi par la suite les analyses multidimensionnelles : une classification de type k-means (non hiérarchique) qui a abouti à la formation de 15 groupes de spermatozoïdes, suivie d'une deuxième classification hiérarchique, qui a réduit le nombre de groupe à 3 (les sous-populations). Ces sous-populations ont été caractérisées par des statistiques descriptives. L'effet du LF et CO proviens de vache de défèrent BCS et du temps sur le % de spermatozoïdes assignés à ses sous-populations des spermatozoïdes a été explorer par l'analyse de variance. Les déférences entre les moyennes ont été évalue par le test de Tukey.

CHAPITRE 2

RESULTATS ET DISCUSSION

2.1.Résultats

2.1.1. Effets du liquide folliculaire

2.1.1.1. L'effet du liquide folliculaire (LF) sur la mobilité globale

L'influence des liquides folliculaires prélevés de vaches d'états corporels différents sur le pourcentage de spermatozoïdes mobiles est représentée par la figure 22.

a. Comparaison des effets des liquides folliculaires par rapport au témoin

La présence du liquide folliculaire a eu un impact sur le pourcentage de spermatozoïdes mobiles à tous les points temporels par rapport à son absence (témoin). Cependant, cet impact a été, la plupart du temps, négatif ($P < 0.05$) pour les liquides folliculaires prélevés des vaches grasses et ce à t1, t2, t5 et t6. La seule fois où ces LF ont eu un effet positif, c'était à t3. Inversement, les liquides folliculaires des vaches à BCS moyen ont agi positivement sur le % des spermatozoïdes mobiles ($P < 0.05$) à partir de 2 heures (t2) jusqu'à 6 heures (t6) d'incubation.

b. Comparaison des effets de LF du vache de déférent BCS entre eux

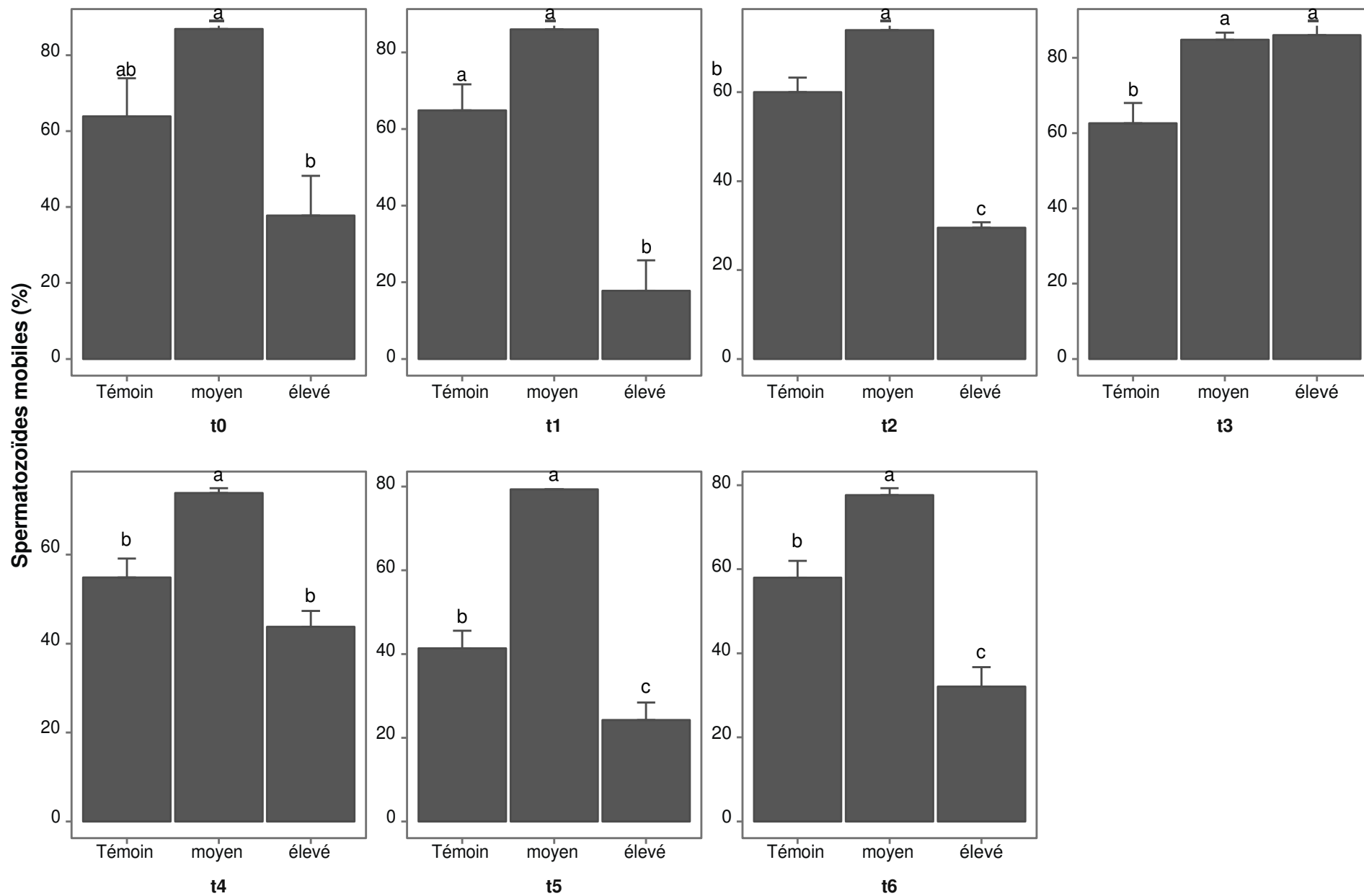
À l'exception de t3 où leurs influences étaient équivalentes, les LF prélevés des vaches à BCS moyen ont stimulé plus le % de spermatozoïdes mobiles comparativement à ceux prélevés de vaches à BCS élevé.

c. Évolution de la mobilité globale dans le temps

Le pourcentage de spermatozoïdes mobiles en l'absence du LF (témoin) a été stable et a évolué entre 40% à un peu plus de 60% durant toute la durée d'incubation.

En revanche, en présence de LF prélevé de vaches à état corporel moyen, la mobilité totale a varié à des niveaux plus élevés (entre plus de 70% à près de 90%) (Figure 23). La stimulation a été plus importante durant la 1^e heure d'incubation (t0 et t1) et à 3 heures par rapport à t2, t3, t5 et t6.

Par ailleurs, le pourcentage de spermatozoïdes mobiles a évolué à des niveaux plus bas (entre 20 et près de 90%) lorsque les spermatozoïdes sont incubés avec les LF de vaches grasses et ce par rapport au témoin (sans LF) et surtout par rapport aux LF des vaches à BCS moyen. Cependant, comme il est bien illustré sur la figure 23, la mobilité totale n'a pas dépassé les 50% durant la plupart des points temporels (le seul point où ce seuil a été dépassé c'était à t3).



BCS

Figure 22 : Effet de liquides folliculaires prélevés de vaches de différents BCS sur le pourcentage de spermatozoïdes mobiles (motilité totale)

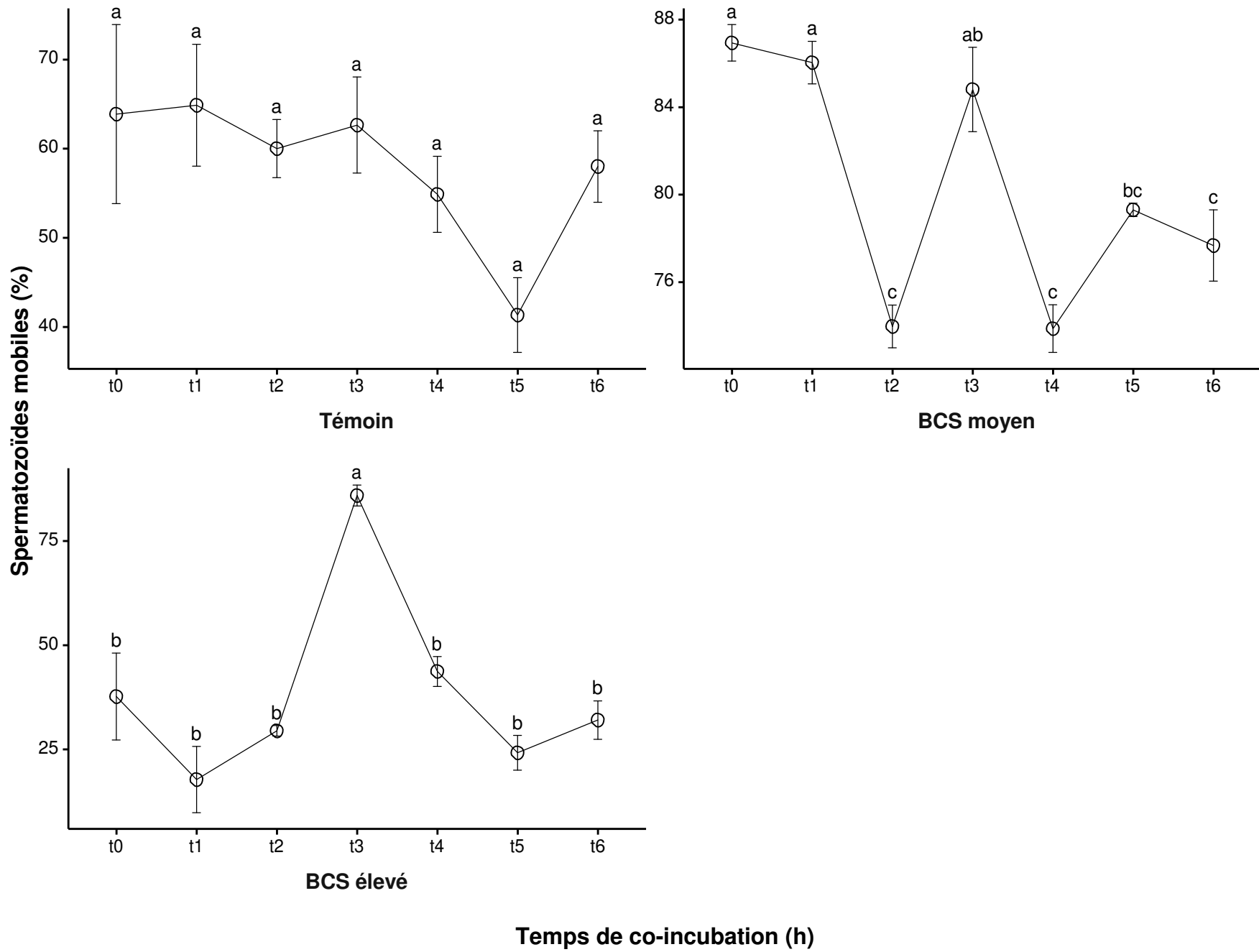


Figure 23 : Évolution du pourcentage de spermatozoïdes mobiles pour chaque BCS en fonction du temps d'incubation

2.1.1.2 Effet du liquide folliculaire sur les sous-populations de spermatozoïdes

a. Description des sous-populations de spermatozoïdes (classes)

Les analyses statistiques multivariées des données générées par le CASA ont mis en évidence l'existence de 3 sous-populations ou classes de spermatozoïdes mobiles. Les caractéristiques générales de ces 3 classes sont résumées dans le tableau et sont décrites dans les paragraphes qui suivent.

Tableau 5: Caractéristiques des sous-populations de spermatozoïdes détectées par les analyses statistiques multivariées.

Parametres spermatiques	classe1	classe2	classe3
n sptz (%)	20 293 (56.0%)	7 148 (19.7%)	8 809 (24.3%)
VCL $\mu\text{m/s}$	48.24	81.00	20.00
VSL $\mu\text{m/s}$	16.71	54.38	02.99
VAP $\mu\text{m/s}$	28.81	62.69	09.22
ALH μm	03.01	03.49	01.56
BCF hz	04.20	06.44	02.07
LIN %	39.37	70.02	16.74
Str %	60.64	87.11	34.57
WOB %	62.82	79.57	47.49

La classe 1 représente la sous-population majoritaire de spermatozoïdes mobiles (56 %). Les spermatozoïdes assignés à cette classe sont caractérisés par des valeurs intermédiaires de tous les paramètres spermatiques. Il est notamment important de signaler la relative grande vigueur (valeurs de BCF et ALH) et linéarité (valeurs de LIN, Str et WOB) des spermatozoïdes inclus dans cette sous-population.

La classe 2, la sous-population la plus réduite (inclus seulement 19.7% du total de spermatozoïdes mobiles), renferme les spermatozoïdes les plus rapides (valeurs de VCL, VSL et VAP les plus élevées), les plus vigoureux (valeurs de BCF et d'ALH les plus élevées) et les plus linéaires (valeurs de LIN, Str et WOB les plus élevées).

Les spermatozoïdes assignés à la classe 3 représentent, en contraste avec ceux de la classe 2, les spermatozoïdes les plus lents les moins vigoureux et les moins linéaires tels que le démontrent les valeurs basses de tous les paramètres (Tableau 5). Cette classe renferme 24.3 % du total de spermatozoïdes mobiles.

Dans la suite du travail, on s'est focalisé sur la sous-population 2 qui représente les spermatozoïdes les plus susceptibles de féconder un ovule par rapport à ceux des deux autres sous-populations.

b. Effet du LF proviens de vache de déférent BCS sur le pourcentage de spermatozoïdes assignés à la classe 2

b.1. Comparaison des effets des liquides folliculaires par rapport au témoin

Comme ça été mis en évidence pour la mobilité globale, les LF issus de vaches d'état corporel moyen ont exercé un effet positif ($P < 0.05$) sur le pourcentage de spermatozoïdes assignés à la sous-population 2, comparativement au témoin sans LF, mais cette fois dès le début de la co-incubation jusqu'à t5. (Figure 24).

Les LF qui proviennent de vaches grasses ont également exercé un effet positif sur le pourcentage de spermatozoïdes les plus rapides (classe 2) mais uniquement à t3 et t4. Par ailleurs, contrairement à ce qui a été remarqué pour la mobilité totale, ces LF de vaches à BCS élevé n'ont pas exercé un effet négatif significatif ($P > 0.05$) sur le pourcentage de spermatozoïdes assignés à la classe 2.

b.2 Comparaison des effets de LF de déférent BCS entre eux

Les LF prélevés de vaches à état corporel moyen ont stimulé ($P < 0.05$) la sous population de spermatozoïdes les plus rapides, les plus vigoureux et les plus linéaires (classe 2) plus que ceux des vaches grasses durant les deux première heures d'incubation (t0 à t2). Toutefois, au-delà de 3 heures (t3 jusqu'à t6), cet effet devient non significatif ($P > 0.05$).

b.3. Évolution des effets en fonction du temps d'incubation

Le pourcentage de spermatozoïdes mobiles assignés à la classe 2, en absence de LF (témoin) est réduit ($< 8\%$) et n'a pas varié de manière significative durant toute la durée d'incubation ($P > 0.05$). En présence de LF de vaches dont l'état corporel est moyen, le pourcentage de ses spermatozoïdes s'est approché de la barre des 30% à t0, a baissé de moitié ($P < 0.05$) à t2 et de nouveau à t6.

Lorsque le sperme est incubé avec le LF de vaches grasses, le pourcentage de spermatozoïdes attachées à la classe 2 a évolué d'une manière non significative ($P > 0.05$) durant toute la durée de la co-incubation et ce entre 0% (t2) et un peu plus de 20% (à t3). Il est intéressant de signaler que les allures des courbes des deux groupes d'états corporels (moyen et élevé) sont quasi-identiques mais avec un décalage vers le bas pour le BCS élevé.(figure 25).

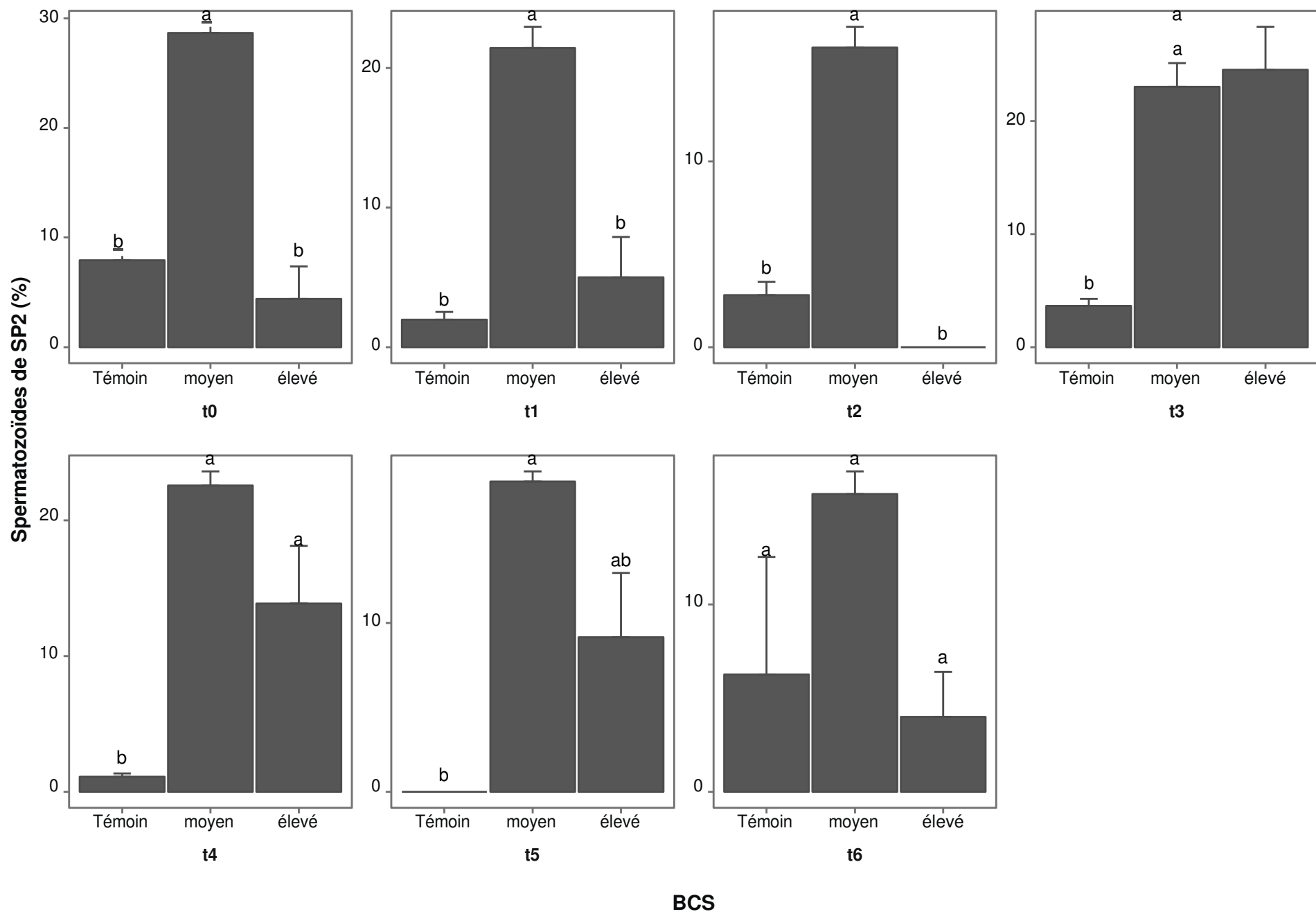


Figure 24 : Effet du liquide folliculaire prélevé de vaches de différents BCS sur le pourcentage de spermatozoïdes assignés à la classe 2

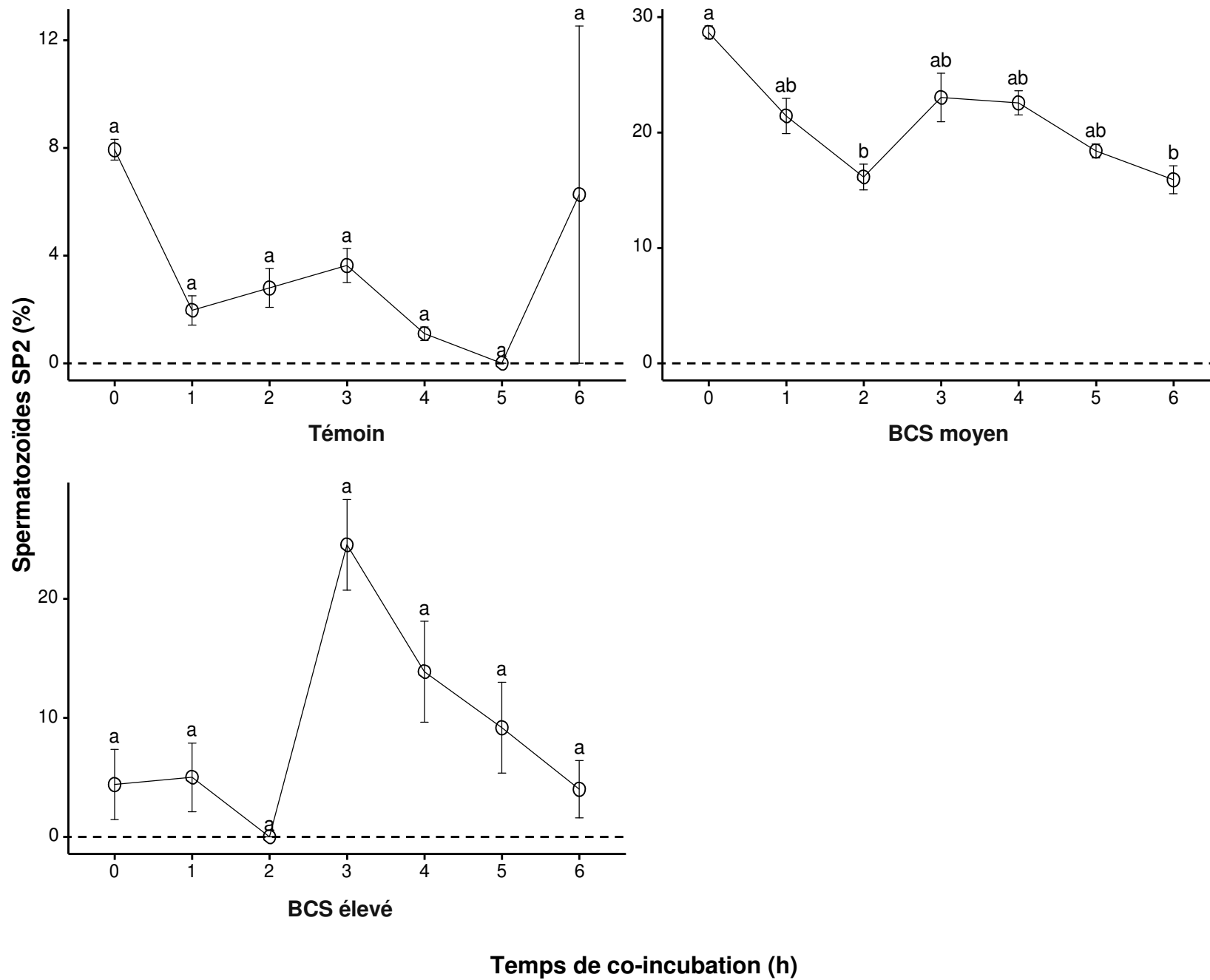


Figure 25 : Évolution du pourcentage de spermatozoïdes assignés à la classe 2 pour chaque BCS en fonction du temps d'incubation

2.1.1.3 Étude du statut oxydatif des spermatozoïdes

a. Effets de la présence du liquide folliculaire (par rapport aux témoins)

Les résultats de l'effet du LF sur la préservation de l'hémoglobine contre la dégradation sous l'action du peroxyde d'hydrogène H_2O_2 sont illustrés sur la (figure 26).

A t_0 , la présence du LF ne semble pas affecté l'absorbance de l'hémoglobine par rapport aux témoins soumis à l'induction du stress oxydatif par H_2O_2 (témoin + contenant l'HG seule et le témoin qui comporte le contenu spermatique et l'HG).

À partir de t_1 , indépendamment de son origine (de vaches de BCS moyen ou élevé) semble ne pas protéger l'HG des effets de H_2O_2 lorsqu'on le compare avec le témoin + et cette impression se confirme avec le temps notamment à partir de t_3 .

En revanche, lorsqu'on le compare avec le témoin renfermant le contenu spermatique sans LF, l'effet des LF issus de vaches à BCS moyen et élevé se manifeste dès la première heure (t_1) et demeure jusqu'à la dernière heure d'observation. Donc, la présence du LF semble améliorer le statut oxydatif des spermatozoïdes.

Il est important de noter que l'HG du témoin négatif présente les valeurs les plus élevées comparées à tous les autres échantillons. La raison en est que dans le cas de l'échantillon témoin négatif l'HG n'est pas soumise à l'oxydation par le H_2O_2 , ce qui ralentirait sa dégradation.

b. Comparaison des effets de LF de déférent BCS

D'après les valeurs d'absorbance données dans la figure 26, une légère différence dans la protection de l'HG contre sa dégradation avec de H_2O_2 est marquée durant toute la période de suivi. Cette différence est toujours en faveur du LF des vaches à BCS moyen par rapport à celles qui ont un BCS élevé.

c. Évolution de l'absorbance de l'HG pour chaque BCS en fonction du temps

Contrairement au témoin (sans LF) qui a connu une chute continue dans l'absorbance de l'HG dès t_0 jusqu'à t_5 (de 0.72 à 0.38 environ) et que cette absorbance est restée à ce niveau (~ 0.38) après t_5 , l'HG traité avec du LF des vaches moyenne sa marqué une légère dégradation dans l'absorbance de t_0 à t_6 (0.75 à 0.60) avant de connaître une diminution importante après t_6 en passant de 0.60 à 0.48.

Pour l'HG incubée avec les LF des vaches à BCS élevé, la (figure 27) illustre une absorbance maximum d'environ 0.70 à t_0 , descend progressivement pour atteindre ~ 0.55 à t_0 et 0.46 à t_{21} . Il semblerait donc que l'HG et le contenu des spermatozoïdes ont un statut oxydatif plus favorable en présence du LF de vaches à BCS moyen. (Figure 28).

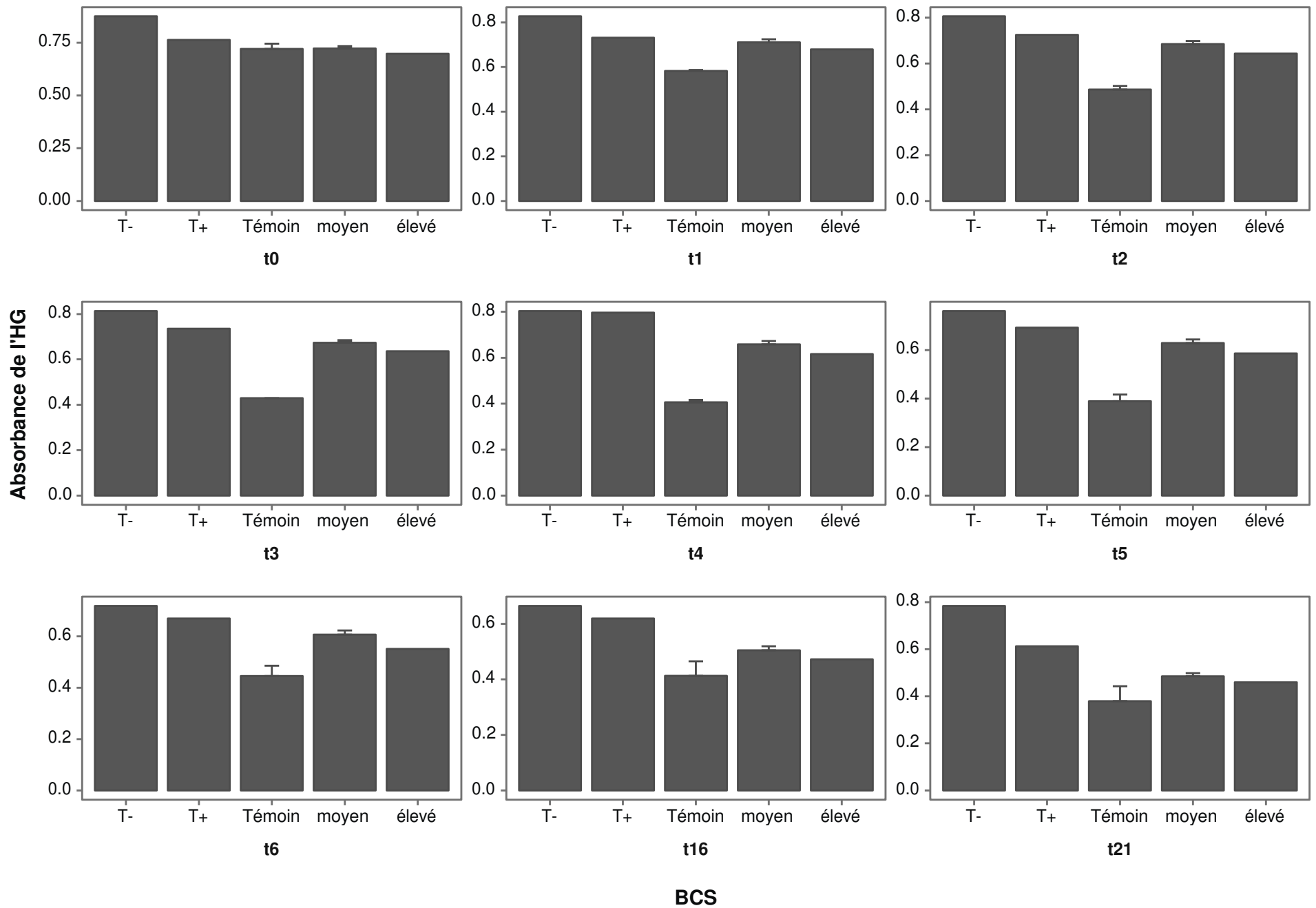


Figure 26 : Effet du BCS sur la concentration de l'hémoglobine exprimée par l'absorbance à 412 nm

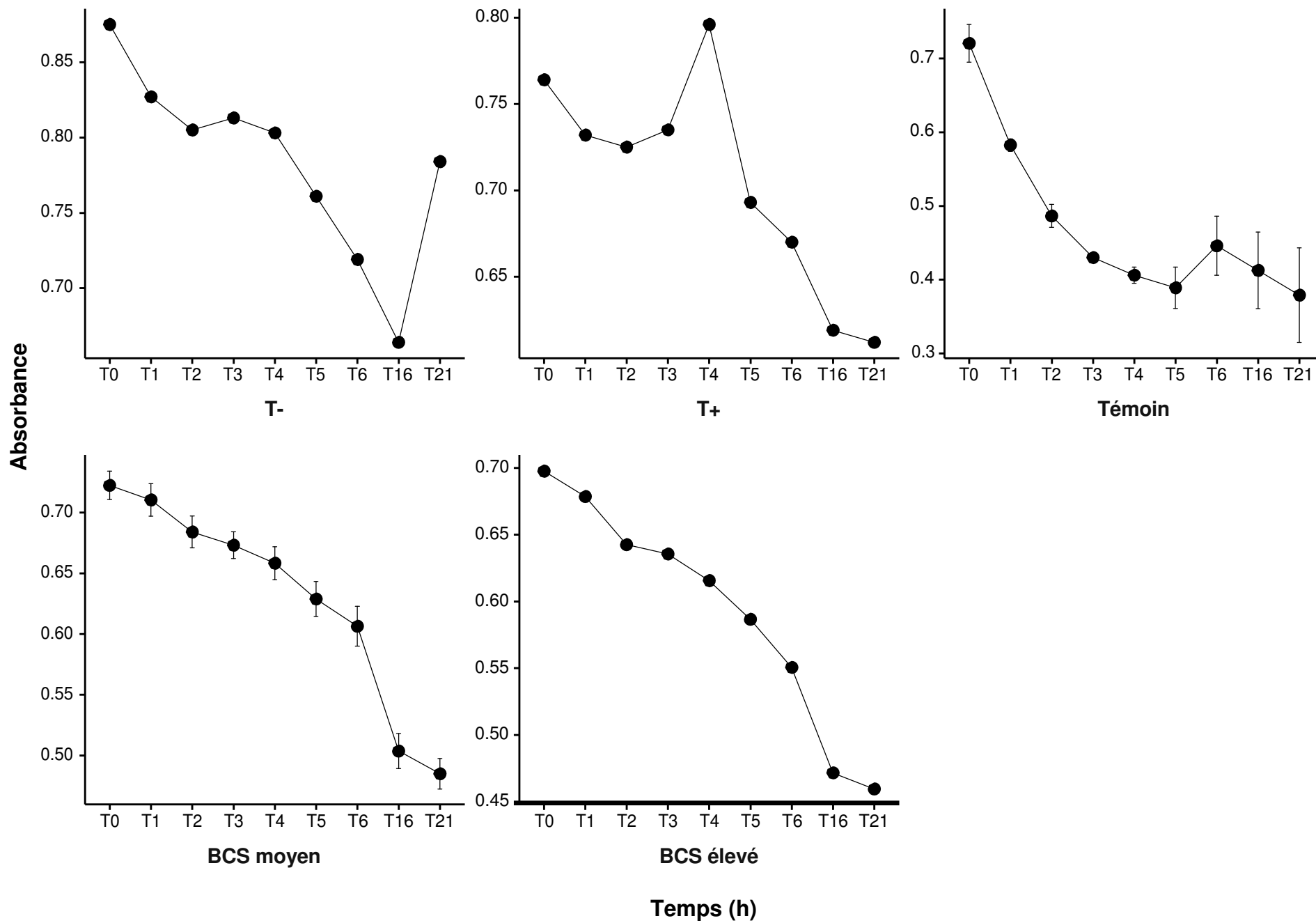


Figure 27 : Cinétique de dégradation de l'HG exposée à H₂O₂

2.1.2. Effet des cellules oviductale

2.1.2.1. Effet des cellules oviductale sur la mobilité totale

a. Effet des cellules oviductales par rapport au témoin

L'effet des cellules oviductales (CO) sur le pourcentage de spermatozoïdes mobiles n'a pas été significatif par rapport au témoin (sans CO) durant toute la durée d'incubation sauf à t1 et t2 où le pourcentage des spermatozoïdes mobiles a baissé ($P < 0.05$) en présence de CO prélevées de vaches à BCS moyen par rapport au témoin sans CO. (Figure 28).

b. Comparaison des effets de CO proviens de vache de déférent BCS entre eux

Globalement, il n'y a pas eu de différences significatives entre les effets des CO prélevées de vaches maigres et moyennes excepté à t2. En effet, à t2, les CO issues de vaches à BCS faible ont stimulé plus ($P < 0.05$) le pourcentage de spermatozoïdes mobiles comparativement à celles issues de vaches à BCS moyen. (Figure 28).

c. Évolution dans le temps

La mobilité totale est restée faible (40 à 60%) et stable (aucune différence significative n'a été notée entre les différents points temporels : $P > 0.05$) pour le témoin (sans CO) durant toute la durée d'incubation.

Pour les échantillons incubés en présence de CO de vaches maigres, le pourcentage de spermatozoïdes mobiles a varié de manière non significative durant les 3 premières heures d'incubation entre près 50% jusqu'aux alentours de 70%, a chuté à 42% ($P < 0.05$) à t4 avant de reprendre son niveau de départ à t5 et t6.

Par ailleurs, la mobilité totale a été également instable et elle a varié entre près de 35% à 48% pour les échantillons incubés avec les CO provenant de vaches de BCS moyens (Figure 29). Pour ces échantillons, la baisse significative de la mobilité a été observée plus tôt (à t2 au lieu de t4) par rapport aux précédents.

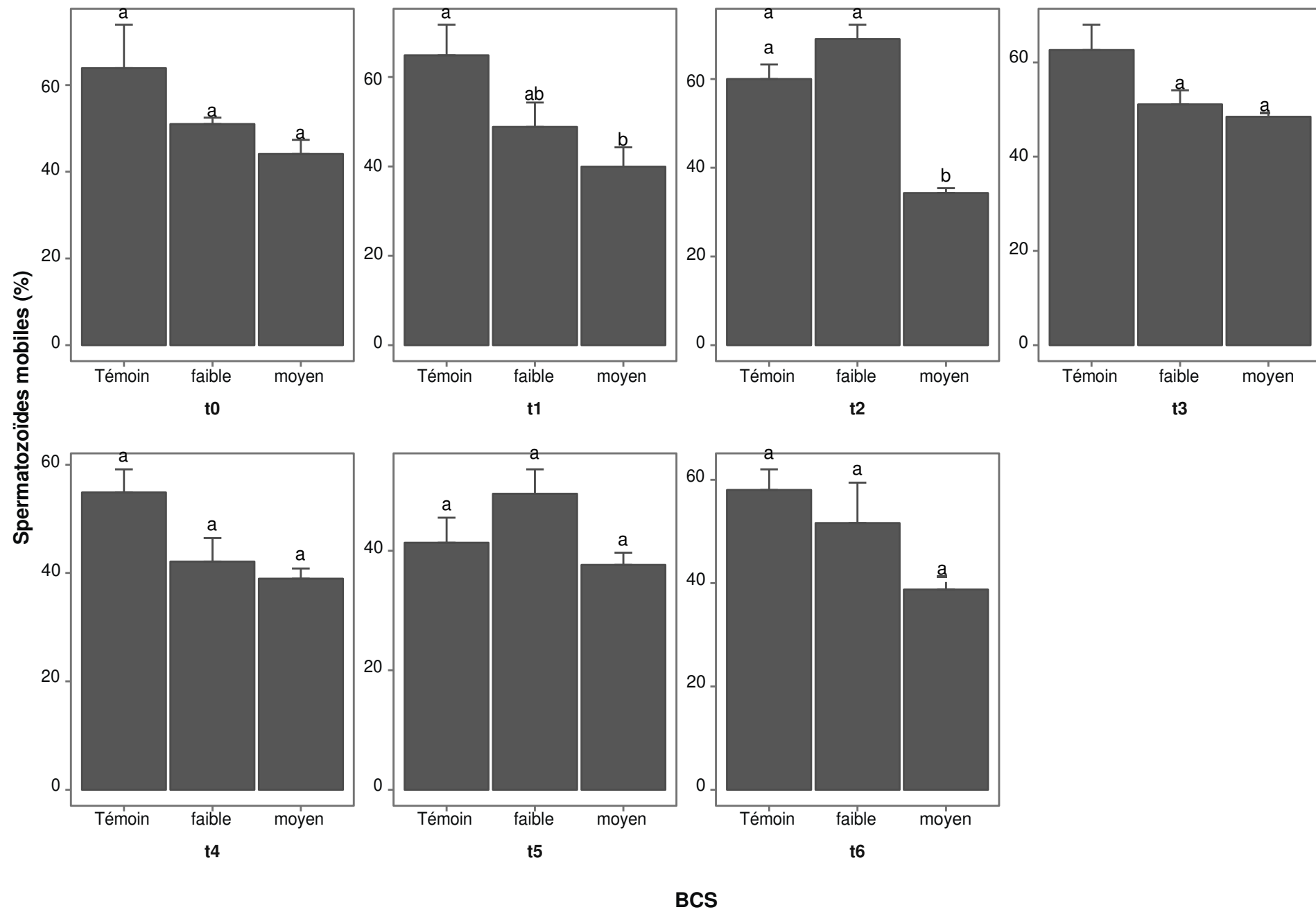


Figure 28 : Effet des cellules oviductales prélevées de vaches de différents BCS sur le pourcentage de spermatozoïdes mobiles (motilité totale)

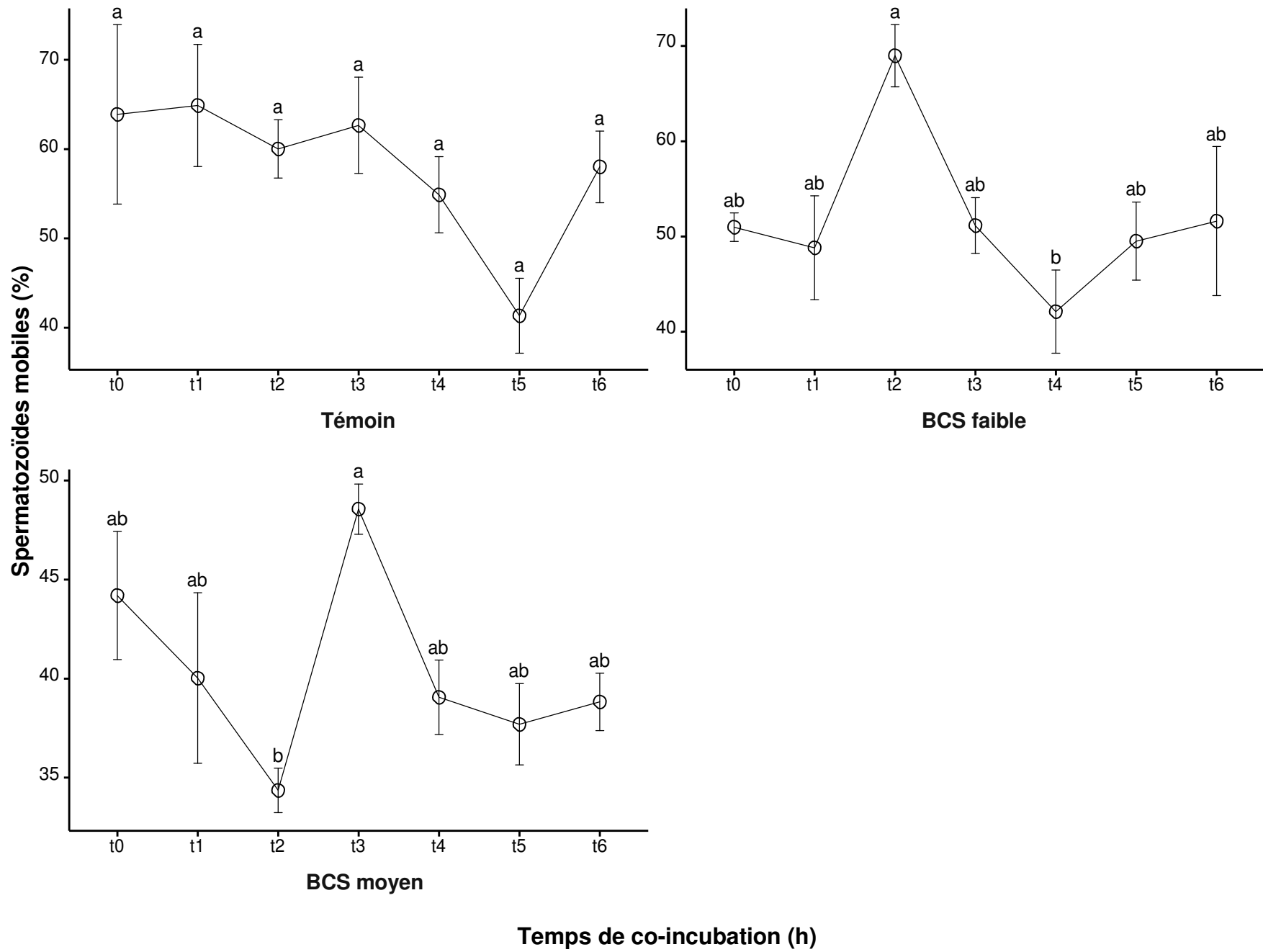


Figure 29 : Évolution du pourcentage de spermatozoïdes mobiles pour chaque BCS en fonction du temps d'incubation

2.1.2.2. Effet des cellules oviductales sur les sous populations des spermatozoïdes

a. Description des classes

Comme pour le LF, les analyses statistiques multivariées des données concernant les CO générées par le CASA ont mis en évidence, également, l'existence de 3 sous-populations de spermatozoïdes mobiles dont les caractéristiques sont résumées dans le tableau et décrites en détail dans les paragraphes qui suivent.

Tableau 6 : Caractéristiques des sous-populations de spermatozoïdes révélées par les analyses statistiques multivariées

Paramètre spermatique	classe1	classe2	classe3
n sptz (%)	10 051 (50.7%)	6 723 (34.0%)	3 039 (15.3%)
VCL $\mu\text{m/s}$	39.78	18.68	81.10
VSL $\mu\text{m/s}$	20.51	02.37	22.53
VAP $\mu\text{m/s}$	26.56	07.95	42.77
ALH μm	02.28	01.47	04.63
BCF hz	05.05	01.67	05.47
LIN %	50.26	14.74	26.74
Str %	72.92	33.77	50.06
WOB %	66.79	43.69	52.82

Le tableau montre que La classe 1, qui représente la sous-population la plus large (50.7% de la population totale de spermatozoïdes motiles) rassemble les spermatozoïdes dont le mouvement est le plus linéaire (valeurs de LIN, Str et WOB les plus élevées) et assez vigoureux (valeur ALH élevée). En revanche, les spermatozoïdes assignés à cette sous population sont moins rapides que ceux de la classe 3.

La 2e sous-population (classe 2), quant à elle, représente les spermatozoïdes les plus lents, les moins vigoureux et les moins linéaires vues les valeurs faibles de tous les paramètres qui caractérisent cette classe (Tableau 6). Cette sous-population renferme 34% de la population totale des spermatozoïdes mobiles.

À l'opposé, les spermatozoïdes de la sous-population 3 (classe 3) sont les plus rapides (valeurs de VCL, VSL et VAP les plus élevées), les plus vigoureux (valeurs de BCF et d'ALH les plus élevées) par rapport aux deux autres sous-populations (classes 2 et 1).

Cependant, ils sont moins linéaires par rapport à ceux de la classe 1 mais plus par rapport à la classe 2 (valeurs de LIN, STR et WOB intermédiaires). Cette sous-population est la moins représentée (15.3%) dans la population totale de spermatozoïdes mobiles.

Dans la suite de cette étude, l'intérêt a été porté uniquement sur la classe 3 qui englobe les spermatozoïdes qui ont le profil de spermatozoïdes hyperactifs et qui sont les plus aptes à féconder un ovule.

b.Effet du CO proviens de vache de déférent BCS sur la sous-population des spermatozoïdes les plus rapides (SP3)

b.1.Effet des cellules oviductales par apport au témoin

Contrairement à ce qui a été constaté auparavant pour la mobilité globale, le pourcentage des spermatozoïdes les plus rapides et les plus vigoureux (classe 3) a été plus élevé en présence qu'en absence (témoin) des CO pour les échantillons co-incubés avec les CO prélevées des vaches à BCS moyen et ce à partir de t3 jusqu'à t5. Il est important de signaler que cet effet positif n'a pas été observé durant la première heure d'incubation (t0 et t1).

Pour les CO issues de vaches à BCS faible, mis à part à t2, où elles ont affecté positivement le pourcentage de spermatozoïdes assignés à la classe 3, dans les autres points elles n'ont pas stimulé le pourcentage de ces spermatozoïdes mieux que le témoin (sans CO). Au contraire, à 1 h et à 6 h, ces CO ont même inhibé la mobilité de ce genre de spermatozoïdes.

b.2. Comparaison des effets des CO de chaque BCS entre eux

Là aussi, contrairement à ce qui a été constaté pour la mobilité totale, le pourcentage de spermatozoïdes assignés à la sous-population 3 a été plus important ($P < 0.05$) dans les échantillons renfermant des cellules oviductales provenant de vaches de BCS de 3 par rapport aux échantillons renfermant des cellules oviductales provenant de vaches maigres à l'exception de t2 où l'effet de cellules oviductales de BCS faible influence plus par rapport au BCS moyenne. (Figure 30).

b.3. Évolution du pourcentage des spermatozoïdes les plus rapides dans le temps

Le pourcentage des spermatozoïdes les plus rapides et les vigoureux (classe 3) a varié entre 5 et 20% de manière non significative ($P > 0.05$) durant toute la durée d'incubation en absence de CO (témoin). Il en est de même pour ceux incubés en présence de CO prélevées de vaches à BCS faible durant les 5 premières heures d'incubation (t0 à t5) où le pourcentage de ce genre de spermatozoïdes a varié entre 5 à 16% de manière non-significative (à t6, ce pourcentage a connu une baisse significative pour atteindre 4%).

Cependant, le pourcentage de spermatozoïdes assignés à cette sous-population (classe 3), en présence de CO issues de vache à état corporel moyen, a connu une hausse significative à t3 en passant d'environ 10% à ~35% à t3 et se stabiliser aux environs de 20% jusqu'à la fin de l'incubation.

À partir des résultats sur la mobilité totale et celles sur la sous-population de spermatozoïdes les plus actifs (classe 3), il apparaît que les CO issues de vaches de BCS moyen exercent simultanément une inhibition sur la mobilité totale et une stimulation pour les spermatozoïdes les plus actifs. (Figure 31).

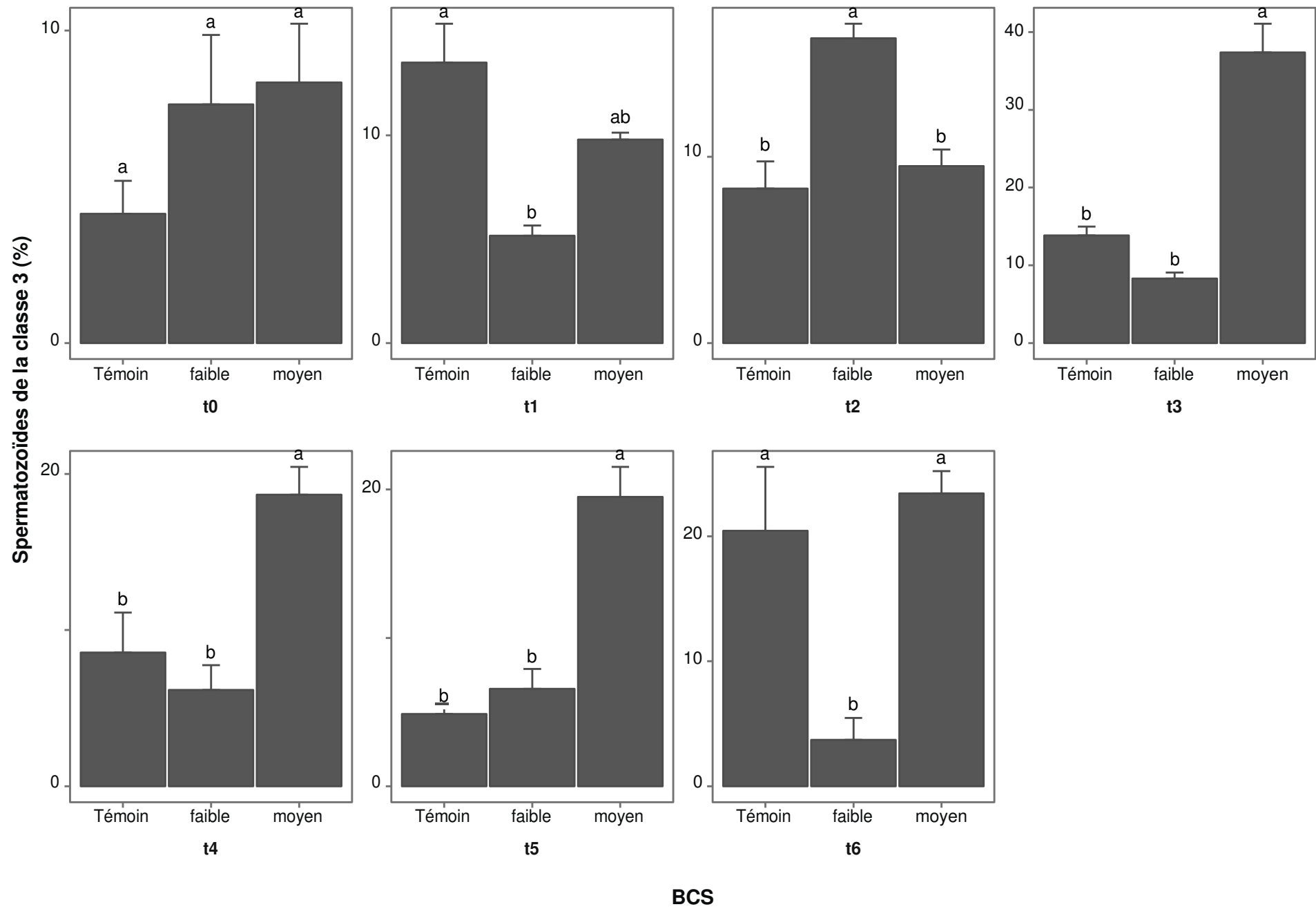


Figure 30 : Effet des cellules oviductales prélevés de vaches de différents BCS sur le pourcentage de spermatozoïdes assignés à la classe 3

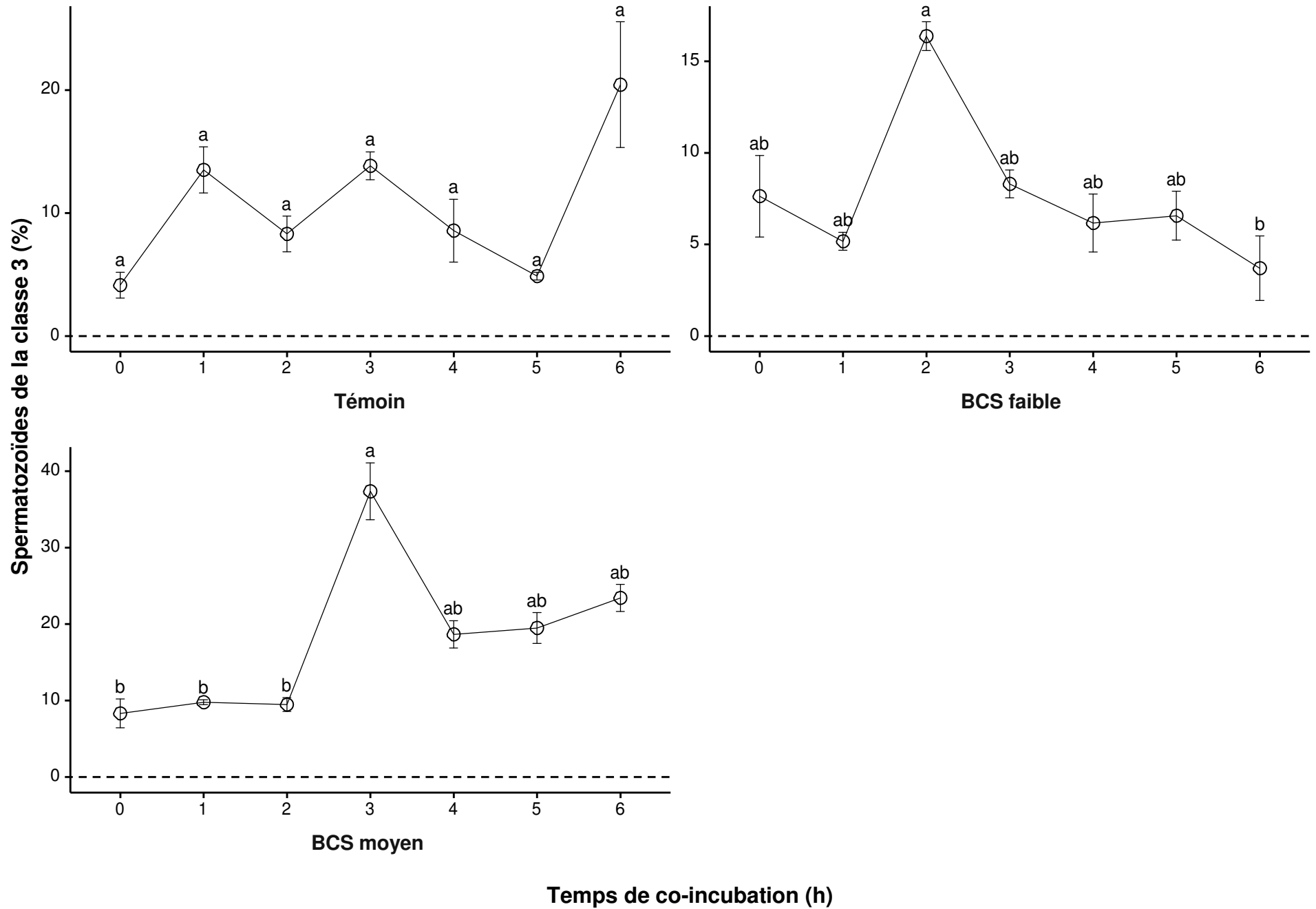


Figure 31 : Évolution du pourcentage de spermatozoïdes assignés à la classe 3 pour chaque BCS en fonction du temps d'incubation

2.1.2.3. Statut oxydatif

a. Effet des cellules oviductales par rapport aux témoins

À la première mesure de l'absorbance juste après la co-incubation de 30 min des échantillons avec l'HG (t0), Il semblerait, d'après la figure 32, que la présence du CO n'ont pas affecté l'état de l'hémoglobine par rapport aux témoins soumis à l'action de H₂O₂ (témoin + contenant l'HG seule et le témoin qui comporte le contenu spermatique et l'HG).

Par ailleurs, à partir de t1 jusqu'à t21 on peut constater que les échantillons de sperme préalablement incubés en présence de CO, et ce quel que soit le BCS des vaches desquelles elles ont été prélevées, ont mieux protégé l'hémoglobine contre la dénaturation que le témoin qui a été incubé en l'absence de CO.

Lorsque la comparaison est faite avec le témoin +, on constate que l'incubation de l'HG avec les échantillons co-incubés auparavant avec les CO n'a eu aucun effet protecteur de l'HG de t0 jusqu'à t16. À t21, il semble même que l'effet a été négatif. (figure 32).

b. Comparaison des effets des CO de chaque BCS entre eux

Comme il est bien illustré sur la figure 33, il apparait qu'il n'y ait aucune différence, durant toute la durée du test, entre les deux groupes de BCS quand à l'amélioration ou ladétérioration du statut oxydatif de l'HG et, par conséquent, des spermatozoïdes.

c. Évolution en fonction de temps

Comme il a été signalé auparavant (voir section 2.1.3.3), l'absorbance de l'HG dans le témoin (sans CO) a connu une chute continue dès t0 jusqu'à t5 (de 0.72 à 0.38 environ) pour se stabiliser finalement à ce niveau (~ 0.38) après.

Pour les échantillons co-incubés préalablement avec les CO, l'absorbance a chuté également mais d'une manière moins importante et plus progressive en passant d'un peu plus de 0.70 à 0.63 à t5 avant de chuter à ~0.48 (BCS faible) et à 0.53 (BCS moyen) à t21.

Il apparait clairement que le fait que les échantillons aient été incubés préalablement avec les CO a amélioré le statut oxydatif (par comparaison au témoin non incubé avec les CO). Cependant, l'effet du BCS semble un peu plus discret. (Figure 33).

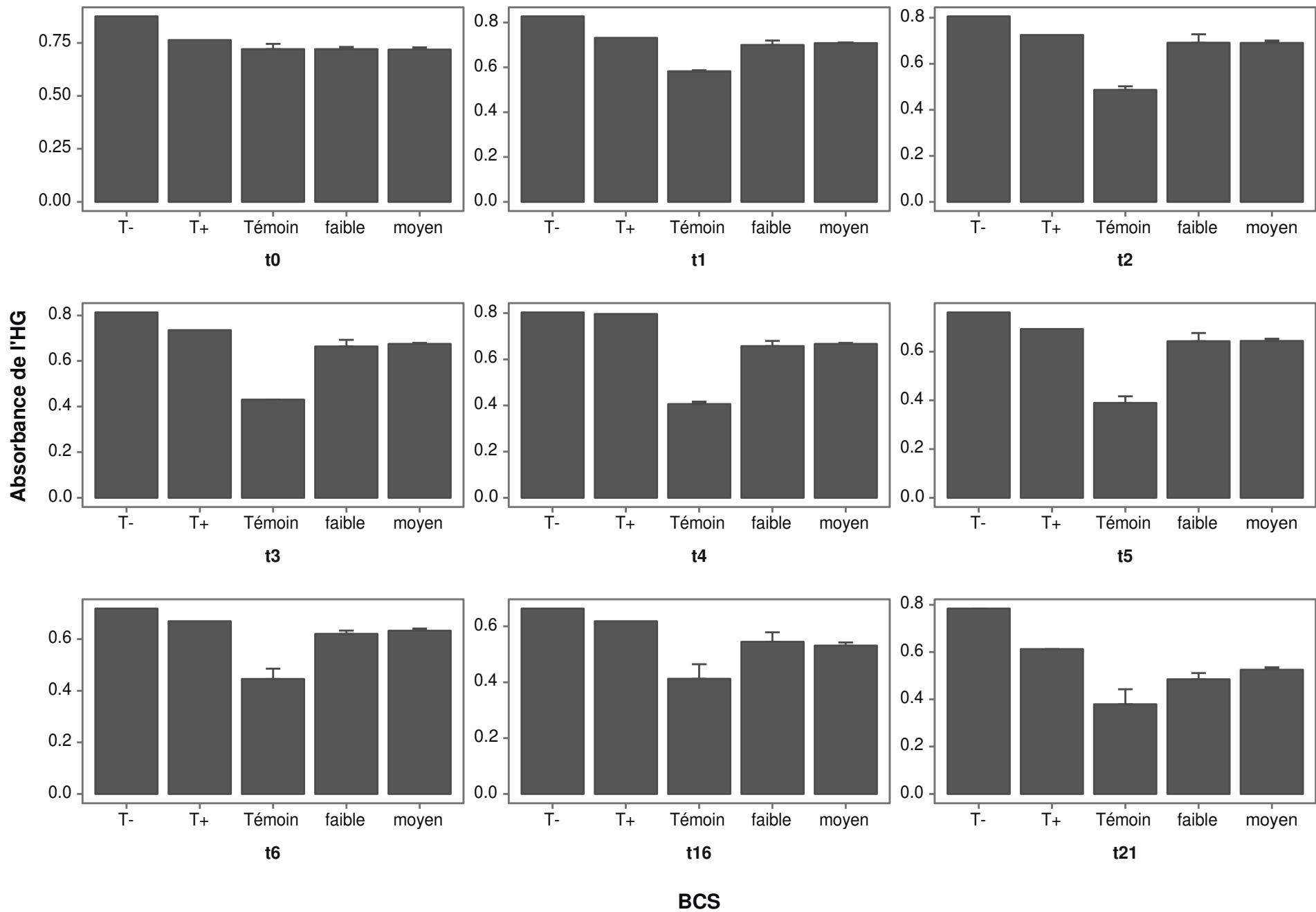


Figure 32 : Effet du BCS sur la concentration de l'hémoglobine exprimée par l'absorbance à 412 nm

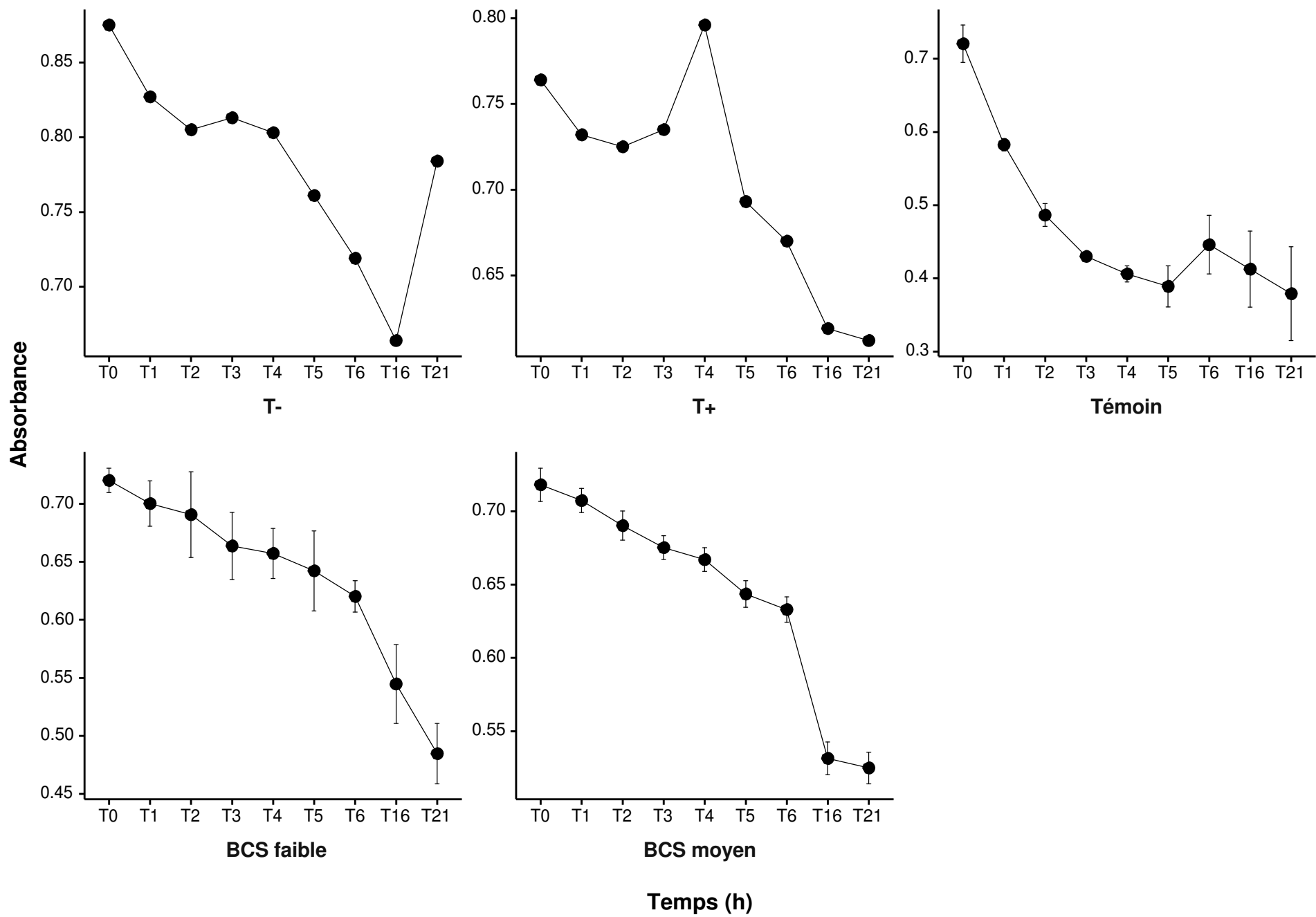


Figure 33 : Cinétique de dégradation de l'Hg exposée à H₂O₂

2.2. Discussions

2.2.1. Effets du liquide folliculaire

Le traitement des spermatozoïdes bovins avec du liquide folliculaire de la vache a montré un impact positif et persistant sur la mobilité pendant la durée de la co-incubation. Cet effet bénéfique du liquide folliculaire sur la mobilité spermatique a été rapporté par plusieurs auteurs et chez de nombreuses espèces incluant le bovin, l'homme et le porc (Gindre et al., 2014). De plus, d'autres auteurs ont souligné les effets positifs exercés par les cellules de la granulosa qui tapissent l'intérieur du follicule sur la mobilité des spermatozoïdes bovin et humain (Bastias et al., 1993).

Par ailleurs, le liquide folliculaire a stimulé le pourcentage de spermatozoïdes appartenant à la sous-population 2 qui sont les plus rapides, les plus vigoureux et les plus progressifs. Ce résultat concorde à celui rapporté par Mc Nutt et al. (1994). En effet, ces auteurs ont suggéré que, chez le bovin, les spermatozoïdes incubés avec le liquide folliculaire deviennent hyperactifs grâce à certains facteurs qui influencent positivement la vitesse de progression linéaire (VSL), le pourcentage de spermatozoïdes rapides et la fréquence de battement de la tête (BCF). De plus, Yanagimachi (1994) et plus récemment Freeman (2013) ont rapporté que la capacitation *in vitro* des spermatozoïdes bovins serait stimulée par le liquide intra-folliculaire. *In vivo*, ils ont suggéré que le liquide folliculaire aspiré dans la trompe utérine lors de l'ovulation agirait sur la capacitation des spermatozoïdes.

Par ailleurs, selon plusieurs études, le liquide folliculaire renferme plusieurs composés qui auraient un effet positif sur la capacitation des spermatozoïdes et la réalisation de la réaction acrosomique évoqués les glucuronidases, enzymes lysosomales présentes dans le liquide folliculaire, qui pourraient intervenir dans le processus de capacitation des spermatozoïdes chez les bovins et le Hamster. Par ailleurs, de nombreux auteurs ont évoqué la progestérone qui aurait, selon eux, un rôle crucial dans le déclenchement de la réaction acrosomique (Freeman, 2013).

D'autre part, notre étude a révélé que la nutrition exerce des effets directs et immédiats sur les paramètres de la mobilité spermatique : en général, le liquide folliculaire des vaches à état corporel moyen agirait mieux sur la mobilité que le liquide folliculaire provenant de vaches dont l'état corporel est élevé, suggère que le liquide folliculaire devient toxique lors d'une balance énergétique négative faible ou élevée, ce qui pourrait expliquer en partie la baisse du pourcentage des spermatozoïdes mobiles.

Par ailleurs, les vaches à BCS très élevé auraient un excès d'acides gras non estérifiés (AGNE). ont montré que les AGNE avaient un effet négatif direct sur la prolifération des cellules de la granulosa, selon Ryan et *al.* (1994), la croissance folliculaire et la maturation des follicules de différentes tailles sont affecté par le niveau énergétique de la ration. L'état corporel idéal pour la croissance folliculaire et l'obtention de follicules de différentes tailles est celui de vache moyenne.

La qualité du liquide folliculaire a été également relié aux fonctions hormonales. explique qu'une diminution dans la sécrétion d'oestradiol du liquide folliculaire chez des vaches à BCS plus faible, pourrait altérer la granulosa. Aussi, Bruneau *et al.* (1998) ont démontré que la leptine agirait directement ou indirectement, en inhibant au niveau hypothalamique la sécrétion du neuropeptide Y, qui a un effet inhibiteur sur la sécrétion de GnRH, et que cette inhibition aurait un effet négatif sur le liquide folliculaire.

D'un autre côté, plusieurs auteurs ont souligné le rôle crucial des antioxydants du liquide folliculaire dans la régulation du statut oxydatif des spermatozoïdes, notamment chez les bovins. Joswik et *al.* (1999) ont suggéré le liquide folliculaire renfermerait des systèmes de défense antioxydants puissants qui font que l'initiation de la peroxydation lipidique est très faible en sa présence. En outre, le rôle du glutathion de la peroxydase dans le maintien de faibles concentrations en hydroperoxydes à l'intérieur du follicule a été suggéré par (Paszkowski et *al.*, 1995). l'activité antioxydante du liquide folliculaire est stimulé par des gonadotrophines exogènes.

2.2.2. Effets des cellules oviductales

Contrairement à ce qui a été observé pour le liquide folliculaire, les cellules oviductales n'ont pas influencé de manière significative la mobilité spermatique durant la durée de coïncubation et la seule fois où l'effet a été significatif (t_2), il a été négatif. Ce résultat concorde à ce qui a été suggéré par Boquest et *al.* (1999) qui a rapporté que les protéines secrétées par les cellules oviductales agiraient négativement sur le mouvement des spermatozoïdes, mais sont contraires aux résultats de Lapointe (1998) qui a mentionné que les cellules oviductales cultivées *in vitro* exerceraient un effet positif et hormono-dépendant sur la motilité et assureraient le maintien de cette motilité des spermatozoïdes par la sécrétion de protéines qui se lieraient à ces derniers.

Par ailleurs, les cellules oviductales ont eu un impact positif sur le pourcentage des spermatozoïdes de la classe 3 ayant le profil de « spermatozoïdes hyperactivés » notamment par leur grande vigueur, leur grande rapidité et leur manque de linéarité. En effet, selon plusieurs

auteurs, de nombreux spermatozoïdes deviennent hyperactivés dans l'oviducte (Shalgi et Phillips, 1998 ; Guerin et *al.*, 1991). Plusieurs études ont rapporté que la co-culture des cellules de l'oviducte avec des spermatozoïdes capaciterait ces derniers et ça a été démontré notamment chez le porc le bovin (Chian et Sirard, 1995 ; Guyader, 1991) et l'homme (Lai et *al.*, 1996).

D'un autre côté, les cellules oviductales provenant de vaches ayant un BCS moyen a eu plus d'impact positif sur le pourcentage de spermatozoïdes les plus actifs (classe 3). En effet, dans plusieurs études, le BCS moyen a été associé aux meilleures performances de reproduction et au meilleur développement des gamètes alors que les BCS faibles et élevés ont été associés avec la dégradation du développement des gamètes et aux mauvaises performances de reproduction (Oba et *al.*, 2013).

D'un autre côté, en présence de cellules oviductales, l'hémoglobine a été mieux protégée comparativement à leur absence ce qui suggérerait que les cellules oviductales disposent de systèmes antioxydants absents dans le spermatozoïde qui aideraient ce dernier à lutter contre les effets du stress oxydatif. En effet, Lapointe (1998) a rapporté l'existence d'une catalase aux niveaux des cellules oviductales qui est absente au niveau des cellules spermatiques et qui aideraient ces dernières à lutter contre les effets délétères notamment de H₂O₂ sur la survie et la mobilité des spermatozoïdes.

CONCLUSION

Conclusion

L'objectif du présent travail a été d'étudier les effets du liquide folliculaire et des cellules oviductales prélevés de vaches de différents états corporels sur la mobilité et le statut oxydatif des spermatozoïdes bovins.

Les résultats ont révélé que le liquide folliculaire a affecté, à la fois, la mobilité totale et le pourcentage de spermatozoïdes les plus actifs et cet effet a persisté durant toute la période d'incubation et ce d'une manière dépendante du BCS. En effet, alors que les liquides folliculaires issus de vaches de BCS moyen ont eu une influence positive, ceux des vaches grasses ont eu, plutôt, un effet inhibiteur.

En contraste, les cellules oviductales n'ont pas stimulé la mobilité totale mieux que le témoin sans cellules oviductales et celles prélevés de vaches à BCS moyen ont même exercé un effet négatif après 2 heures d'incubation. Par contre, l'effet des cellules oviductales a été semblable à celui du liquide folliculaire lorsque la lumière est dirigée sur l'effet sur les spermatozoïdes les plus actifs : positif et persistant pour le BCS moyen et plus ou moins l'inverse pour le BCS faible.

D'autre part, le liquide folliculaire et les cellules oviductales paraissent avoir la capacité d'améliorer le statut oxydatif des spermatozoïdes : il semble que le liquide folliculaire et les cellules oviductales contiennent des systèmes antioxydants puissants (la catalase entre autres), dont les spermatozoïdes sont dépourvus, capable, dans le cas du test effectué (test à l'hémoglobine), de dégrader le peroxyde d'hydrogène, chose que le contenu des cellules spermatiques seules ne peuvent pas faire, du moins au même degré qu'en présence du liquide folliculaire et des cellules oviductales.

Enfin, les résultats obtenus dans ce présent travail pourraient contribuer à améliorer la mobilité spermatique bovine, augmenter l'efficacité de l'insémination artificielle et les chances de fécondation.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

- Aebi, H. (1974). Catalase in methodes of enzymatique analisis., 673–684.
- Agarwal, A. (2012). Protection of epididymal spermatozoa from oxydativ damege. *Humana Press*, 95–118.
- Araki. (1998). Mammalian oviduct- epecific glycoprotein: molecular characterisation and potential rol in the fertilization process.
- Baba, L., & Mc Grath, L. (2008). Oxygen free radicals: effects in the new born period., *8*, 256–264.
- Bangham, A. (1961). Electrophoresis characteristics of ram and rabbi spennatozoa., *155*, 292–305.
- Barone, R. (1978). Anatomie comparée des mammifères domestiques. *Vigot Frères*, 894.
- Barone, R. (2001). Anatomie comparée des mammifères domestiques. *Vigot*, 896.
- Bastias, M., Karnijo, H., & Osteen, K. (1993). Assessrment of Hunan sperm functional changes after in-vitro co incubation with cells retrieved from the human female reproductive tract., *8*, 1670–1677.
- Bazin, S. (1984). *Grille de notation de l'état d'engraissement des vaches pie-noires*. (I. T. de l'Élevage Bovin, Ed.) (6th ed.).
- Beckers, P., Drion, F., Ectors, F., Hanzen, C., Houtain, J., & Lonergan, P. (1996). Régulation de la croissance folliculaire et lutéale. *Le Point Vétérinaire*, *28*, 881–891.
- Beckman, K., & Ames, B. (1998). The free radical theory of aging matures. *Physiological Reviews.*, *78*, 547–581.
- Bellik, J. (2014). Etude des interactions cellules animales – Substances vegetales actives. *Thèse Doctorat*, 95.
- Bosio, L. (2006). Relations entre la fertilité et évolution de l'état corporel chez la vache laitière. *Thèse de Doctorat*.
- Boss, I. (2002). (Rutaceae).etudes des activités biologique fagara xanthoxyloides lam. *These de Pharmacie*, 133.
- Bousquet, D. (1998). In "mieux maîtriser la reproduction des espèces domestiques pré le transfert d'embryons., 1–11.
- Boyer, S., Davis, R., & Katz, D. (1989). Automated semen analysis cur problem obstetric gynecology., *12*, 167–200.

- Bruemmer, E. (2006). Collection and freezing of epididymal stallion sperm., *22*(3), 677–682.
- Bruneau, G., Vaisse, C., Caraty, A., & Monget, P. (1998). La leptine : une clef pour la reproduction., 16.
- Buřdak, Ł., Łabuzek, K., Buldak, J. R., Kozłowski, M., Machnik, G., Duřawa-buřdak, A., & Okopien, B. (2014). Pharmacological reports metformin affects macrophages ' phenotype and improves the activity of glutathione peroxidase , superoxide dismutase , catalase and decreases malondialdehyde concentration in a partially ampk-independent manner in lps-stimulated hu. *Pharmacologique Reports*, *66*, 418–429. <http://doi.org/10.1016/j.pharep.2013.11.008>
- Bureau, M. (2000). L'influence des cellules d'oviducte sur les gamètes dans un système de fécondation in vitro. *Memmoire*, 96.
- Cadet, J., Bellon, S., & Berger, M. (2002). Recent aspects of oxidative dna damage: guanine lesions, measurement and substrate specificity of dna repair glycosylases., *383*(6), 93.
- Chabory, E., Damon, C., Lenoir, A., Kausel-Mann, G., Kern, H., Zevnik, B., ... Vernet, P. (2009). Epididymis Selene-independent glutathione peroxides 5 maintains sperm and integrity in mice. *The Journal of Clinical Investigation*, *119*, 2074–2085.
- Chang, M. (1968). Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes. *Nature*, *168*, 697–698.
- Chauhan, A., & Chauhan, V. (2006). Oxidative stress in autism. *Pathophysiology. Aug*, *13*(3), 171–81.
- Chavan, V., & Melinkeri, R. (2013). Study of protein carbonyl group, nitric oxide and mda (index of lipid peroxidation) as biomarkers of oxidative stress in type 2 diabetes mellitus. *Community Med*, *4*(2), 294–9.
- Chelikani, P., & Loewen, F. (2004). «Diversity of structures and properties among catalases», *61*, 192–208.
- Chenoweth, P. (2007). Clinical reproductive anatomy and physiology of the bull., 217.
- Chevion, M., & Stadtman, E. (2000). Human studies related to protein oxidation: prote in carbonyl content as a marker of damage., 108.
- Chian, R., Lapointe, S., & Sirard, M. (1995). Capacitation in vitro of bovine sperrnatozoa by oviduct epithelial cells monolayer conditioned medium., *42*, 318–324.
- Chilliard, Y., Remond, B., Agabriel, J., Robelin, J., & Verite, R. (1987). Variations du contenu digestif et des réserves corporelles au cours du cycle gestation-lactation. *Bull Tech Crzv Theix Inra*, *70*, 117–131.

- Conrad. (2005). Vertical distribution of structure and function of the methanogenic archaeal community in lake dagow sediment. *Environ. Microbiol*, 7, 1139–1149.
- Crozet, N. (1991). La fécondation in vivo et in vitro., 315–337.
- Dacheux, F. (2001). L'épididyme et les glandes annexes., 290–315.
- Dalle-Donne, L., Rossi, R., Colombo, R., Giustarini, D., & Milzani, A. (2006). Biomarkers of oxidative damage in human disease., 601–663.
- Deletang, F., Roche, M., Hivorel, P., Mialot, P., Vagneur, M., Drew, B., & Duclos, P. (2002). Physiologie de la reproduction.
- Derivaux, J. (1971). Reproduction chez les animaux domestiques., 175.
- Derivaux, J., & Ectors, F. (1986). Reproduction chez les animaux domestiques. *Revue. Louvain-La-Neuve*, 11 –41.
- Dumont, P. (1997). Appréciation de la fonction sexuelle du taureau reproducteur., 28, 19–32.
- Eddy, E., & O'Brien, D. (1994). The spennatozoon. *Raven Press*, 29–77.
- Edmonson, A., Lean, I., Weaver, L., Farver, T., Webster, G., & A, B. (1989). Condition scoring chart for holstein dairy cows. *J Dairy Science*, 72, 68–78.
- Elmore, R. (1985). Evaluating bulls for breeding soundness: Concentration and motility of semen., 80, 80–84.
- Ennuyer, M. (2000). Les vagues folliculaires chez la vache. Applications pratiques a la maîtrise de la reproduction. *Point Vet*, 31(209), 377–383.
- Favier, A. (1997). Radicaux libres oxygénés et antioxydants.
- Ferguson, J. (1991). Nutrition and reproduction in dairy cows. *Vet.Clin.Of North Amer.: Food Anim*, 7, 483–507.
- Fieni, F., Tainturier, D., Bruyas, J., & Battu, I. (1995). Physiologie de l'activité ovarienne cyclique chez la vache. *Bull Gtv*, 4, 35–49.
- Fontbonne, A. (1992). Les indispensables de l'animal de compagnie.
- Fontbonne, A., & Dumon, C. (1992). Prélèvement et examen de la semence chez le chien. *Book Chapter*.
- Freeman, S., & England, G. (2013). Storage and release of spermatozoa from the pre---uterine tube reservoir.

Froment, P. (2007). *Note d'état corporel et reproduction chez la vache laitière*. École Nationale Vétérinaire d'Alfort.

Garverick, H. (1997). Ovarian follicular cysts in dairy cows., *80*, 995– 1004.

Gawronska, B., Pukku, T., & Wasowicz, G. (1999). Oestrogen- dependent expression of h/ hcg receptors in big follopian tube and their role in relaxan of the oviduct. *Reprod. Fertil*, *115*, 293–301.

Gindre, P. (2014). *Les voies d'amélioration des résultats de fertilité lors d'insémination avec de la semence sexée chez les bovins : Focus sur l'insémination intracornuale*. L'universite Claude-Bernard - Lyon I.

Gloria, A., Contri, A., De Amicis, I., Robbe, D., & Carcio, A. (2011). Differences between epididymal and ejaculated sperm characteristics in donke., *117–122*.

Guerin, J., Ouhibi, N., Regnier, Vigouroux, G., & Menezo, Y. (1991). Movement characteristics and hyper activation of human sperm on different epithelial ce11 monolayer's. *Int J Androl*, *14*, 412–422.

Guerin, P., & Menezo, Y. (1995). Hypotaurine and taurine in gamete and embryo environments: De novo synthesis via the cysteine sulfinic acid pathway in oviduct cells., *3*, 333– 43.

Guyader, C., & Chupin, D. (1991). Capacitation of fresh bovine spermatozoa on bovine epithelial oviduct cell monolayers. *Theriogenology*, *36*(3), 505–512.

Hansen, C., Srikanthakumar, A., & Downey, B. (1991). Presence of follicular fluid in the porcine oviduct and its contribution to the acrosome reaction. *Molecular Reproduction and Development*, *30*, 148–153.

Hanzen, C. (2005). Les troubles de fertilité chez la vache. *Le Point Vétérinaire*, 84–88.

<http://spiral.univlyon1.fr/polycops/HistologieFonctionnelleOrganes/GenitalMasculin/gm6rd.html>). (n.d.).

Hunter, R. (1988). The follopian tubes : Their role in fertility and infertility., *191*.

Iguer-Ouada, M., & Verstegen, J. (2001). Evaluation of the “Hamilton thorn computer-based automated system” for dog semen analysis. *Theriogenology*., *55*, 733–749.

Jean-Blain, C. (1995). Adaptation ou défaillance hépatique au cours du cycle de reproduction chez les ruminants. *Point Vét*, *27*, 9–6.

Jeyendran, R., Van Der Ven, H., & Perez-Pelaez, M. (1984). Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *Journal of Reproduction and Fertility*., *70*, 219–225.

Johnston. (2001). Laboratoire national de contrôle des reproducteurs.

Joswik, M., Wolczynski, S., Jozwik, M., & Szamatowicz, M. (1999). Oxidative stress markers in preovulatory follicular fluid in humans., *5*(5), 409–413.

Kaabi, M., Paz, P., Alvarez, M., Boixo, J.-C., Rouissi, H., & Anel, L. (2003). Effect of epididymis handling conditions on the quality of ram spermatozoa recovered post-mortem., *60*(7), 1249–1259.

Kabera, F. (2008). Appréciation de la qualité de la semence bovine produite au centre national d'amélioration génétique (cnag) de dahra au senegal. *Thèse Doctorat*.

Kevin, L., Fcarcsi, Novalija, E., & Stowe, D. (2005). Reactive oxygen species as mediators of cardiac injury and protection: The relevance to anesthesia practice. *Anesthesia and Analgesia.*, *101*, 1275–1287.

Knobil, E., & Neill, J. (1988). The physiology of reproduction. *Raven Press*, 793–814.

Koechlin, R. (2006). Effet scavenger des radicaux oxygénés et inhibiteur de la xanthine oxydoreductase des extraits de *Cachrys libanotis*.

Kohen, & Nyska. (2002). Effet scavenger des radicaux oxygénés et inhibiteur de la xanthine oxydoreductase des extraits de *Cachrys libanotis*.

Korochkina, E., Johannisson, A., Goodla, L., Morrell, J., & Axner, E. (2014). Effect of prostatic fluid on the quality of fresh and frozen-thawed canine epididymal spermatozoa. *Theriogenology*, *82*(9), 1206–1211.

Kutzler, M. (2005). Semen collection in the dog., *64*(3), 747–754.

Lai, Y., Chang, F., & Lee, C. (1996). Coculture of human spermatozoa with reproductive tract cell monolayers can enhance sperm functions better than coculture with vero cell monolayers., *13*, 417–422.

Lapointe, S. (1998). Influence du tractus génital femelle sur la survie des spermatozoïdes bovins. *Thèse*.

Luck, H. (1954). Purification of a sperm motility stimulator from porcine follicular fluid., *17*, 31–40.

Mann, T. (1964). The biochemistry of semen and of the male reproductive tract.

Marien, D. (1993). La dynamique folliculaire chez les bovins .apports du suivi échographique. *Thèse de Doctorat Vétérinaire*, 139.

Marnet, B., Vieitez, G., & Milhet, P. (2000). Computer-assisted assessment of sperm morphology : Comparison with conventional techniques. *International Journal of Andrology*, *23*, 22–28.

- Martinez-Pasteur, F., Garcia-Macias, V., Alvarez, M., Chamorro, C., Herraiez, P., Paz, P., & Anel, L. (2006). Comparison of two methods for obtaining spermatozoa from the cauda epididymis of Iberian red deer. *Theriogenologie*, *65*(3), 471–485.
- Mavrog, I., Anis, P., Verhage, H., & Fezleabas, A. (1997). *International journal of andrology*, 217–226.
- McNutt, G. (1927). The corpus luteum of pregnancy in the cow (*bos taurus*) and a brief discussion of the clinical ovarian changes., *27*, 286–299.
- McNutt, T., Olds-Clarke, P., Way, A., & Suarez, S. (1994). Effect of follicular or oviductal fluids on movement characteristics of bovine sperm during capacitation in vitro., *15*, 328– 336.
- Meizel, S., & Working, P. (1980). Further evidence suggesting the hormone stimulus of hamster., *22*, 211–216.
- Melo, M., Araújo, A., Rocha, C., Almeida, E., Siqueira, R., Bonjardim, L., ... Quintans-Júnior, L. (2008). Purification, physicochemical properties, thermal analysis and antinociceptive effect of atranorin extracted from *Cladonia kalbii*. *Biol Pharm Bull*, *31*, 1977–1988.
- Meunier, S. (2002). *Caractérisation de puissants antioxydants et de ligands du fer synthétiques, comme agents protecteurs des dommages oxydatifs, par de nouveaux tests de criblage a haut débit*. Université de Paris sud U.F.R.
- Mialot, J., & Constant, F. (2001). La croissance folliculaire ovarienne chez les bovins., 163–168.
- Miettinen, P. (1991). La croissance folliculaire ovarienne chez les bovins. *Acta. Vet. Scand*, *32*, 189–196.
- Morrow, D. (1986). Diagnosis, treatment and prevention of reproductive diseases in small and large animals., *2*, 1143.
- Mugnier, S. (2009). *Mécanismes de la fécondation dans l'espèce équine : approche comparée entre les modèles équin et porcine*. Université François - Rabelais de tours école.
- Noblanc, A. (2013). *Contrôle des dommages oxydants au noyau spermatique apports des modèles murins knock-out pour des glutathion peroxydases*. Université Blaise Pascal.
- Nzengue, Y. (2008). *Comparaison des mécanismes de toxicité redox du cadmium, du cuivre et du zinc : place des métallothionéines et de p53 thèse*. Université Joseph Fourier – Grenoble 1.
- Oba, M., Miyashita, S., Nishii, R., Koiwa, M., & Koyama, H. (2013). Effects of serum obtained from dairy cows with low or high body condition score on in vitro embryo development. *Journal of Dairy Science*, *96*, 1668–71.

- Paccard, P. (1995). L'alimentation et ses répercussions sur la fécondité., 1, 124–135.
- Palmer, C., & Barth, A. (2003). Comparison of the bull mate sperm quality analyser with conventional means of assessing the semen quality and breeding soundness of beef bulls. *Animal Reproduction Science*, 77, 173–185.
- Paszkowski, T., Traub, A., McMaster, D., & Al, E. (1995). Selenium dependent glutathione peroxidase activity in human follicular fluid. *Clin. Chim. Acta*, 236, 173–180.
- Peina Martinez, A. I. (2004). Canine fresh and cryopreserved semen evaluation. *Animal Reproduction Science*, 209–224.
- Peter, A., Perrone, M., & Asem, A. (1995). Bovine ovarian follicular fluid vitronectin content is influenced by follicle size. *Theriogenology*, 43, 1239–1247.
- Peters, A., & Ball, P. (1995). Reproduction in cattle. In *Blackwell science* (p. 234).
- Pfeifer, N., Stadler, P., & Briese, C. (2001). Derivation of digital terrain models in the scoop+ environment. *Proceedings of Epee Workshop on Airborne Laser Scanning and Interferometric Sar for Detailed Digital Terrain Models, Stockholm, Sweden*.
- Pierre, F. (2007). Note d'état corporel et reproduction chez la vache laitière. *These Doctora*, 106.
- Poncet, J. (2002). *Etude des facteurs de risque de l'infertilité dans les élevages bovins laitiers de l'île de la réunion : influence de l'alimentation sur la reproduction*. Université de Toulouse.
- Rodrigo, R. (2009). Oxidative stress and antioxidants: Their role in human disease., 358.
- Rodriguez-Martinez, H. (2003). Laboratory semen assessment and prediction of fertility. *Reproduction Domestic Animal*, 38, 312–318.
- Ryan, D., Snijdgers, S., Condon, T., Grealy, M., Sreenan, J., & O'farell, K. (1994). Endocrine and ovarian responses and pregnancy rates in dairy cows following the administration of a gonadotrophin releasing hormone analog at the time of artificial insemination or at mid-cycle post insemination. *Anim Reprod. Sci.*, 34, 179–191.
- Seguin, B. (1980). Ovarian cysts in dairy cows. *Philadelphia*, 199–204.
- Shalgi, R., & Phillips, D. (1988). Motility of rat spermatozoa at the site of fertilization. *Biol Reprod*, 39, 1207–1213.
- Sies, H. (1997). Oxidative stress: Oxidants and antioxidant ants., 82, 291–295.
- Sorg, K. (2004). Effet scavenger des radicaux oxygénés et inhibiteur de la xanthine oxydoreductase des extraits de *Cachrys libanotis*.

- Steinbeck, M., Khan, A., Appel WH, J., & Karnovsky, M. (1993). The DAB-Mn+ cytochemical method revisited: validation of specificity for superoxide. *J Histochem Cytochem*, 41, 1659–1667.
- Taveau, J. (2013). *Vache - échographie - gynécologie - cycles - gestant*.
- Thibault, C., & Levasseur, M. (2001). La reproduction chez les mammifères et l'homme., 928.
- Thibier, M. (1977). La fonction sexuelle du jeune taurillon (Bos taurus). *Thèse. Sciences*.
- Vagneur, M. (1992). Biochimie de la vache laitière appliquée a la nutrition. La dépêche technique, 28, 26.
- veillet, X. (1995). Etude des problèmes de reproduction dans les elevages bovins lait vendéens., 185.
- Walker, J., Winet, H., & Freund, M. A. (1982). Comparison of subjective and objective sperm motility evaluation. *Journal of Andrology*, 3, 184–192.
- Watson, D., Hubbard, B., & Wiese, D. (2000). Self-other agreement in personality and affectivity: effects of acquaintanceship, trait visibility, and assumed similarity. *Journal of Personality and Social Psychology*, 78, 546–558.
- Wulf, D. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function physiological. *Reviews Published 1 January*, 82, 47–95.
- www.casa-scopus.com. (n.d.).
- Yanagimachi, R. (1994). Mammalian fertilisation., 189 –317.
- Yaye, A. (2009). Congélation automatique de la semence de taureaux azawak au niger: comparaison de deux programmes avec deux diluer. *Mémoire D'ingénieur Des Techniques Agricoles.*, 70.
- Young, I., & Woodside, J. (2001). Antioxidants in health and disease. *Journal of Clinicial Pathology.*, 54, 176–186.
- Zembelli, D. (2006). Semen collection in cats: techniques and analysis. *Theriogenology*, 66(2), 159–165.
- Zhu, W., Newton, C., Daaka, Y., Friedman, H., & Klein, T. (1994). Tetrahydrocannabinol enhances the secretion of interleukin-1 from endotoxin-stimulated macrophage. *Pharmacol Exp Ther*, 270, 1334–1339.

RESUME

L'objectif du présent travail est d'évaluer l'effet du liquide folliculaire et des cellules oviductales prélevés de vaches de différents états corporels, sur la mobilité et le statut oxydatif des spermatozoïdes. Le liquide folliculaire et les cellules oviductales ont été prélevés à partir des matrices de vaches récupérées de l'abattoir, et le sperme utilisé est collecté par la méthode retrograde-flushing des épидидymes de taureaux. La mobilité a été évaluée objectivement en utilisant le système CASA en combinaison avec la méthode d'analyse statistique multidimensionnelle, pour tirer le maximum de bénéfice des données fournies par le CASA. Le test à l'hémoglobine a été utilisé pour juger le statut oxydatif des spermatozoïdes par le degré de protection de l'hémoglobine par le contenu des cellules spermatiques. Les résultats obtenus montrent que le liquide folliculaire et les cellules oviductales influencent différemment la mobilité spermatique mais ils ont amélioré grandement le pourcentage de spermatozoïdes les plus rapides, les plus vigoureux et les plus linéaires ainsi que le statut antioxydant des spermatozoïdes par rapport au témoin. Le liquide folliculaire et les cellules oviductales issues des vaches à état corporel moyen (NEC=3) ont amélioré la mobilité et sa qualité et ont mieux protégé les spermatozoïdes des effets du stress oxydatif, induit par H₂O₂ comparativement à ceux issus, respectivement, des vaches grasses (NEC =4) et maigres (NEC ≤2).

Mots clés : Liquide folliculaire, cellules oviductales, état corporel, mobilité spermatique, sous-populations, statut oxydatif.

ABSTRACT

The objective of this work was to evaluate the influence of follicular fluid and oviductal cells collected from cows with different BCS, on mobility and oxidative status of bovine spermatozoa. Follicular fluid and oviductal cells were collected from cow's matrices recovered from the slaughterhouse, and the used sperm were collected by retrograde-flushing method from epididymis of bulls. Mobility was assessed objectively using the CASA system in combination with the multivariate statistical analysis method, to derive maximum benefit from data provided by CASA. The test to hemoglobin was used to judge the oxidative status of the sperm by the degree of hemoglobin protection by the content of sperm cells. The results show that follicular fluid and oviductal cells had influenced differently sperm mobility, but they had improved greatly percentage of the most rapid, the most vigorous and the most linear spermatozoa and sperm antioxidant status when compared to the control. Follicular fluid and oviductal cells from cows with average body condition (BCS = 3) improved mobility and this quality and antioxidant status of sperm better than cows with, respectively, high (BCS = 4) and low (BCS ≤2) body condition.

Keywords: Follicular fluid, oviduct cells, BCS, sperm motility, sub-populations, oxidative status.