

*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 Sciences Biologiques de l'environnement**  
**Filière : Biologie et Physiologie Animale**  
**Option : Bio Ressource Animale et Biologie Intégrative**



**Réf :.....**

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

**MASTER**

***Thème***

**Influence du plasma prélevé de vaches de différents états corporels sur la motilité et le statut oxydatif des spermatozoïdes**

Présenté par :

**HATTOU Dalila & TARAFT Sonia**

Soutenu le : **13 Juin 2016**

Devant le jury composé de :

M. Iguer-ouada Mokrane

M. Nait Mouloud Mohamed

Mme. Boulila Farida

Professeur

MAA

MCA

Président

Encadreur

Examinatrice

**Année universitaire : 2015 / 2016**

# Remerciements

Nous remercions Dieu le tous puissant pour tous ces dons accumulés tout au long de notre vie et de nous avoir permis, aujourd'hui, la réalisation de notre projet de master, encore un rêve qui se réalise grâce au Dieu.

Nous tenons à présenter nos remerciements à notre promoteur

**Mr NAIT MOULOUD M**

Pour la proposition du thème de notre mémoire et pour leurs disponibilité, conseils, soutien et encouragement et qui nous ont permis de mener à terme 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 remerciement vont à :

Mr IGUEROUDA M, vous nous faite l'honneur et le plaisir d'accepter la présidence de jury.

Mme BOULILA F, nous vous remercions d'avoir accepté de juger ce travail et de siéger parmi les membres de jury.

# **DEDICACES**

*Merci Allah (mon dieu) de m'avoir donné la capacité d'écrire et de réfléchir,  
la force d'y croire et la patience d'aller jusqu'au bout de rêve.*

*Je dédie ce modeste travail :*

*A l'homme de ma vie, mon exemple éternel, mon soutien moral et source de joie  
et de bonheur, celui qui s'est toujours sacrifié pour me voir réussir, qui éclair  
mon chemin et m'illumine de douceur et d'amour ; que dieu te garde pour nous  
papa.*

*A ma très chère maman en signe d'amour, de reconnaissance et de gratitude.*

*Pour tous les soutiens et les sacrifices dont elle a fait preuve à mon égard.*

*A ma grande sœur et ma deuxième mère : Salima qui m'a toujours soutenue  
moralement et encouragée.*

*A mes sœurs Fadila et Fatima et mes frères : Mourad, Salim et Moumouh.*

*A ma belle sœur Siham et son poussin Mohamed.*

*A tous les membres de ma famille tentes et oncles.*

*A ceux que j'aime beaucoup, qui m'ont toujours soutenus et s'étaient toujours à  
mes côtés, mes chères amis spécialement : Zouzou, Baya, Dina, Zakia, Rafik,  
Rahim, Samir, et Amine.*

*A tous mes collègues de promotion BRABI.*

*Je termine avec la personne qui a partagé tout le travail et qui a supporté mon  
humeur au moment de stress, mon binôme : **Sonia**.*

*Et à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin pour que ce projet soit  
possible, je vous dis merci.*

# **DÉDICACE**

*Je remercie le bon dieu de m'avoir donné le courage pour réaliser ce travail et la patience pour aller jusqu'au bout du parcours de mes études.*

*Je dédie du plus profond de mon Cœur ce manuscrit:*

*A mon cher père qui ma toujours soutenu et conseille dans ma vie.*

*A ma chère mère qui a toujours été la pour moi, je la remercie pour ses encouragements et son soutien. Que dieu leurs accorde une longue vie.*

*A mon frère mustapha.*

*A mes sœurs : Salima et son mari Hocine et Fatiha.*

*A tous mes chères amis et surtout: Latifa, yasmına, fairouz,  
Ama chère binome et amie Dalila et à toute sa famille.*

*A toutes ma promotion de BRABI de 2016.*

**Sonia**

# Sommaires

## Liste des abréviations

## Liste des tableaux

## Liste des figures

## Introduction.....1

## Partie théorique

### Chapitre 1 : Alimentation, reproduction et état corporel

#### 1.1. Relation entre la reproduction et l'alimentation.....3

#### 1.2. Rappels sur les besoins nutritionnels de la vache.....3

##### 1.2.1. Nature des besoins .....3

##### 1.2.2. Types des besoins.....4

#### 1.3. Notion de bilan énergétique.....5

##### 1.3.1. Définition.....5

##### 1.3.2. Évaluation du bilan énergétique.....6

#### 1.4. Notion de note de l'état corporel (NEC).....6

#### 1.5. Le statut énergétique, la NEC et la reproduction.....6

### Chapitre 2 : mobilité spermatique

#### 2.1. Anatomie de l'appareil de reproducteur de taureau.....8

##### 2.1.1. Description des organes.....8

###### 2.1.1.1. Section glandulaire.....8

###### 2.1.1.2. Section tubulaire.....8

###### 2.1.1.3. Sinus uro-génital.....9

#### 2.2. Méthode de récolte de sperme.....10

##### 2.2.1. Récolte au vagin artificiel.....10

##### 2.2.2. Électro-éjaculation.....10

##### 2.2.3. Massage transrectal.....11

##### 2.2.4. Technique de récolte de sperme epididymaire.....11

#### 2.3. Évaluation de qualité de sperme.....13

##### 2.3.1. Analyse macroscopiques.....13

##### 2.3.2. Analyse microscopique.....13

### Chapitre 3 : le stress oxydatif

#### 3.1. Stress oxydatif.....17

3.1.1. Définition.....	17
3.1.2. Les espèces réactives de l'oxygène (EROS).....	17
3.1.2.1. Origine des radicaux libres (RL).....	17
3.1.3. Les cibles biologiques du stress oxydant.....	18
3.1.3.1. Les lipides.....	19
3.1.3.2. Les acides nucléiques ADN.....	20
3.1.3.3. Les protéines.....	20
3.2. Les antioxydants.....	20
3.2.1. Définition.....	20
3.2.2. Antioxydant enzymatiques.....	20
3.2.2.1. Les superoxydes dismutases.....	20
3.2.2.2. La catalase.....	21
3.2.2.3. La Glutathion peroxydase.....	21
3.2.2.4. La glutathion réductase.....	21
3.2.3. Les antioxydants non enzymatiques.....	22
3.2.3.1. vitamine E.....	22
3.2.3.2. vitamine A.....	22
3.2.3.3. vitamine C.....	22
3.3.évaluation du stress oxydatif.....	22
3.3.1. Évaluation de l'oxydation lipidique.....	22
3.3.2. L'activité antioxydant.....	23
3.4. Le test à hémoglobine.....	24

## **Partie expérimentale**

### **Chapitre 1 : matériels et méthodes**

1.1. Matériels.....	25
1.1.1. Matériels biologiques.....	25
1.1.1.1.Le sperme epididymaire bovin.....	25
1.1.1.2. Plasma sanguin bovins.....	25
1.1.2. Produits chimiques utilisés.....	26
1.1.3. Matériels de laboratoire utilisés.....	26
1.2. Méthodes.....	27
1.2.1. Collecte de sperme epididymaire.....	27
1.2.2. Traitement des échantillons du sang.....	29
1.2.3. Dilution du sperme et des échantillons de plasma.....	29

1.2.3.1. Dilution du sperme epididymaire.....	29
1.2.3.2. Dilution de plasma.....	29
1.2.4. Co-incubation du sperme avec le plasma.....	29
1.2.4.1. Pour évaluation de la mobilité.....	29
1.2.4.2. Pour évaluation du stress oxydatif par le test à hémoglobine.....	30
1.3. Analyses statistiques.....	31
<b>Chapitre 2 : résultats et discussion</b>	
Résultats.....	33
2.1. Effet du plasma sur la mobilité totale.....	33
2.2. Effet du plasma sur les sous des populations des spermatozoïdes.....	36
2.2.1. Description des classes.....	36
2.2.2. Effet du BCS sur les sous-populations des spermatozoïdes les plus rapides (SP1) .....	37
2.3. Statut oxydatif.....	37
Discussion.....	43
Conclusion perspective.....	45

### **Liste des Tableau :**

**Tableau n°1 :** Note attribuées aux éjaculats suivant leur motilité massale.

**Tableau n°2 :** Notes attribuées aux éjaculats suivant leur motilité individuelle dans une grille de notation de 0 à 5.

**Tableau n°3 :** Les principales espèces réactives

**Tableau n°4 :** caractéristique des sous-populations de spermatozoïdes.



## Listes des figures

**Figure n°1** : Appareil génital du taureau.

**Figure n°2** : Schéma du vagin artificiel.

**Figure n°3** : Sonde de l'électro-éjaculateur.

**Figure n°4** : collecte de sperme avec la méthode « retrograde-flushing ».

**Figure n°5** : représentation schématique des différentes vitesses mesurées par CASA.

**Figure n°6** : Les origines des espèces réactives.

**Figure n°7** : Les différentes cibles des Espèces Réactives de l'Oxygène.

**Figure n°8**: Les trois types de SOD.

**Figure n°9** : sang complet des vaches prélevé dans des tubes contenant du citrate de sodium.

**Figure n°10** : centrifugeuse de marque ALC centrifugeuse 4206.

**Figure n°11** : analyseur informatique de marque SCA.

**Figure n°12** : Sonicateur VCX 130 (130 watts).

**Figure n°13** : Testicule après l'avoir dépourvu de la tunique vaginale.

**Figure n°14** : Epididyme juste après sa dissection du testicule.

**Figure15**: récolte de sperme avec la méthode rétrograde.

**Figure n° 16** : plasma récupérés après centrifugation des échantillons de sang.

**Figure n° 17** : Effet du plasma prélevé de vaches de différents BCS sur le pourcentage de spermatozoïdes mobiles (motilité totale).

**Figure n° 18** : Évolution du pourcentage de spermatozoïdes mobiles pour chaque BCS en fonction du temps d'incubation.

**Figure n° 19**: Effet du plasma prélevé de vaches de différents BCS sur le pourcentage de spermatozoïdes assignés à la classe 1.

**Figure n° 20** : Évolution du pourcentage de spermatozoïdes assignés à la classe 1 pour chaque BCS en fonction du temps d'incubation.

**Figure n° 21** : Effet du BCS sur la concentration de l'hémoglobine exprimée par l'absorbance à 412 nm.

**Figure n° 22**:Cinétique de dégradation de l'HG exposée à H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

# Liste des abréviations

**8-OH-dG:** 8-hydroxy-desoxyguanosine

**8-OH-G:** 8-hydroxy-guanosine

**ABTS:** 2, 2'- azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid diamonium salt

**ALH:** Amplitude Lateral Head.

**BCF:** Beat Cross-Frequency.

**BCS:** body condition score

**CASA:** Computer-Assisted Semen Analysis.

**CAT:** Catalase

**CDs:** Cyclodextrines

**Cu, Zn-SOD:** Cuivre-Zinc Superoxyde Dismutase

**ER :** Espèces réactives

**ERNs :** espèces réactives de l'azote

**EROs :** espèces réactives de l'oxygène

**FSH:** Follicle Stimulating Hormone= Hormone Folliculostimulante.

**GnRH:** Gonadotrophin Releasing Hormone= Gonadolibérine.

**GPx:** glutathions peroxydases

**GR:** Glutathion réductase

**GSH:** Glutathionne

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:** Peroxyde d'hydrogène

**HO<sup>•</sup> :** Radical hydroxyle

**HOCL :** Acide hypochloreux

**IGF:** Insulin-like Groth Factor.

**LH:** Luteinizing Hormone= Hormone lutéinisante.

**LIN:** Linearity

**MDA:** Malondialdehyde

**NADPH:** Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate

**NEC:** note d'état corporel.

**NO :** Monoxyde d'azote

**O<sub>2</sub><sup>-</sup> :** Anion superoxyde

**OMS:** Organisation Mondiale de la Santé.

**ONOO<sup>-</sup> :** Peroxynitrite

**RL:** radicaux libres

**RNS:** Reactive nitrogen species

**ROS:** Reactive oxygen species

**SCA:** sperm class analyser

**SOD:** Superoxide dismutase

**STR:** Straightness.

**TBA:** Thiobarbituric acid

**TBARS:** Thiobarbituric acid reactive substances

**VAP:** Velocity Straight Pathway.

**VCL:** Velocity Curved Line

**VSL:** Velocity Straight Line.

## Résumé

L'objectif de présent travail est d'étudier l'influence du plasma prélevé de vache de différents états corporels sur la motilité et le statut oxydatif des spermatozoïdes. Le plasma est obtenu après centrifugation de sang prélevé de vache à différents états corporels. Le sperme utilisé est collecté de l'épididyme de testicules de taureaux récupérés de l'abattoir local par la méthode rétrograde. Nous avons utilisé comme témoin le milieu de dilution du sperme (la solution physiologique de NaCl à 0.9%). D'autre part, on a essayé de montrer l'effet de stress oxydatif sur les spermatozoïdes et de le relier à la mobilité. Le plasma issu de vaches à BCS moyen s'est distingué en montrant non seulement un effet significatif sur la mobilité totale et le pourcentage de spermatozoïdes les plus rapides plus que les autres traitements et témoins mais en plus cette influence a persisté dans le temps. Le test à l'hémoglobine a révélé que l'hémoglobine, et par déduction, les spermatozoïdes sont mieux protégés contre le stress oxydatif en présence du plasma par rapport au témoin sans plasma et ce quel que soit le BCS. La stimulation constatée de la mobilité peut être expliquée en partie par l'amélioration du statut oxydatif

**Mot clés :** plasma, spermatozoïdes, BCS, mobilité, sous-populations, stress oxydatif.

### Abstract

The objective of this work is to study the influence of plasma collected from cows of different BCS on motility and oxidative status of sperm. Plasma is obtained after centrifugation of blood collected from cows at various BCS. The sperm used is collected from the recovered bulls testes epididymis of the local abattoir by the retrograde-flushing method. We used as control sperm dilution medium (physiological solution of NaCl 0.9%). On the other hand, we tried to show the effect of oxidative stress on sperm and link it to mobility. The plasma from cows with average BCS distinguished not only by showing a significant effect on total mobility and the percentage of faster sperm than other treatments and control but also this influence has persisted over time. The test revealed that the hemoglobin, and by inference, the sperm are better protected against oxidative stress in the presence of plasma comparatively to control without plasma supplementation and that whatever the BCS. The stimulation of mobility can be explained in part by improvement the oxidative status.

**Key words:** plasma, sperm, BCS, mobility, subpopulations, oxidative stress.

## **Introduction générale**

La reproduction est une fonction biologique fondamentale, qui assure la continuité et la diversité des espèces. La reproduction bovine est un domaine en pleine évolution avec l'augmentation du nombre d'inséminations artificielles et le développement du transfert d'embryons. Quel que soit la méthode utilisée, l'objectif principal est d'obtenir une bonne fertilité.

Depuis plusieurs années, on rapporte une baisse de fertilité chez les bovins. Cette baisse est rapportée dans plusieurs pays à travers le monde. Plusieurs études tentent d'identifier les facteurs pouvant expliquer cette baisse de fertilité (Badinand, 2000).

La mobilité spermatique est un élément indispensable au transport des spermatozoïdes à travers le tractus génital femelle et la réussite de l'amélioration de la fertilité passe inévitablement par sa qualité.

Plusieurs auteurs ont essayé de stimuler la mobilité par de nombreuses substances et parmi ces auteurs, certains ont exploré l'influence de plasma sanguin sur les paramètres de la mobilité des spermatozoïdes notamment chez l'homme (Liu et al.,1986 ; De Lamirande et al.,1991 ; Akerlof et al.,1989).

La réussite de la reproduction a été également liée à la nutrition notamment énergétique. Le déficit énergétique, évalué notamment dans la pratique par la note d'état corporel (BCS) affecterait, entre autre, la fonction ovarienne, folliculaire et lutéale, et contribue à allonger la durée de l'œstrus après le vêlage.

L'objectif du présent travail est l'étude de l'effet du plasma prélevé de vaches de différents états corporel sur les paramètres de la mobilité et le statut oxydatif des spermatozoïdes chez les bovins et l'exploration de l'influence de l'état corporel de la vache sur ces paramètres tout en cherchant à mettre en évidence une éventuelle corrélation entre le stress oxydatif et les caractéristiques spermatiques.

La première partie de ce mémoire est une revue bibliographique où ont été évoqués des notions générales sur la relation entre l'alimentation et la reproduction, un rappel sur l'anatomie et la physiologie du taureau, les méthodes de collectes et d'évaluation de la mobilité spermatique et enfin, une revue de la littérature concernant le stress oxydant et ses marqueurs.

La seconde partie, expérimentale, englobe la présentation des matériels et méthodes utilisés afin d'évaluer les effets du plasma et le stress oxydatif sur la mobilité du sperme bovin en fonction de la note d'état corporel, en plus d'une exposition et une discussion des résultats obtenus et pour finir une conclusion générale et perspectives.

## **Chapitre I : Alimentation, reproduction et état corporel**

### **1.1. Relation entre la reproduction et l'alimentation**

L'impact de la nutrition sur la reproduction est reconnu depuis longtemps. On rapporte que les sociétés anciennes étaient très au courant des effets de la nutrition et de la lactation sur la reproduction. Aristote a écrit que la nutrition était le facteur environnemental le plus important dans le contrôle de la conception. Dans notre société moderne, les effets de la nutrition sur la reproduction vont dans le même sens, les animaux en mauvaise condition, ou perdant de poids ont généralement des performances reproductives décevantes. La raison qui est le plus souvent citée pour expliquer ce phénomène, c'est la hiérarchisation des propriétés des nutriments. Après le vêlage, la vache dirige en priorité l'énergie consommée vers la production, et en second lieu vers la reprise de la condition de chair (tissus adipeux). C'est seulement une fois que ces besoins sont satisfaits que le processus de reproduction va être ré-initié (Brisson, 2003).

### **1.2. Rappels sur les besoins nutritionnels de la vache**

Un bon programme d'alimentation pour vaches laitières doit indiquer les quantités qui sont appropriées, les quantités nécessaires ainsi que la manière et le moment de les servir (Wheeler, 1996).

Les besoins alimentaires des vaches laitières sont similaires à ceux de tout être vivant chez lequel existe une activité continue dans toutes les cellules: de l'énergie, matières azotées, des minéraux, des vitamines et de l'eau (Meyer et Denis, 1999). Ils sont fonction de l'ensemble de ses dépenses d'entretien, de production (lait) et de gestation (Faverdin et *al.*, 2007).

#### **12.1. Nature des besoins**

##### **a. Les besoins d'entretien**

Ils correspondent à la consommation des nutriments nécessaires au maintien de la vie d'un animal pour qui il n'y a pas de variations de la masse corporelle, qui se traduisent par l'utilisation d'énergie pour l'accomplissement des fonctions de base de l'organisme (respiration, circulation sanguine, tonicité musculaire) et pour le renouvellement d'une partie des matériaux constructifs des tissus animaux (Barret, 1992).

Jarrige (1988) estime que les dépenses d'entretien sont proportionnelles au poids de l'animal et plus précisément à la surface qui est liée au poids.

##### **b. Les besoins de croissance**

La croissance de la vache laitière se produit pendant plusieurs lactations, elle n'est importante que chez les primipares notamment en cas de vêlage à 2 ans et chez les multipares

la croissance est plus réduite et les besoins correspondant sont considérablement négligeables (Sérieys, 1997).

### **c. Les besoins de gestation**

Ils correspondent aux besoins nécessaires pour la fixation d'un ou plusieurs fœtus, mais aussi celui de l'utérus, des structures associées et les glandes mammaires. Ces dépenses sont relativement négligeables pendant les deux premiers tiers, elles augmentent plus vite en dernier tiers de gestation (Jarrige, 1988).

Sérieys (1997) a montré que les besoins augmentent plus vite que le poids de fœtus du fait que celui-ci s'enrichit en protéines, graisse et minéraux.

### **d. Besoins de la production laitière**

Ces besoins correspondent à l'ensemble des synthèses et exportations réalisées par la mamelle pour la production laitière. Ils varient selon la qualité de lait produit, sa composition en taux butyreux et en taux protéique (Yennek ,2010).

Les besoins de la vache laitière varient en fonction du stade de la lactation ; d'où le début de celle-ci correspond à une période critique dans la vie de la vache, elle se caractérise par un être forte et très rapide augmentation des besoins nutritifs alors que l'appétit ne progresse que lentement et modérément (Wolter, 1997).

## **1.2.2. Types des besoins**

### **a. Les besoins en énergie**

Une des principales fonctions d'un aliment est l'apport d'énergie car la vache laitière en a besoin pour son entretien, sa production laitière mais aussi pour sa croissance et le développement de son veau. L'énergie est souvent le facteur limitant chez la vache laitière haute productrice en début de lactation. Un déficit énergétique influence négativement la production laitière et le taux protéique du lait, entraîne des risques d'acétonémie, de fièvre de lait voire même des problèmes de fertilité. Parallèlement aux besoins en énergie nécessaire à ses fonctions, le ruminant doit également avoir de l'énergie pour sa flore stomacale, retrouvée dans les matières organiques fermentescibles.

### **b. Les besoins en matières azotées**

L'animal renouvelle en permanence ses protéines corporelles et les processus de digestion provoquent les pertes cellulaires, donc les protéines. Ces fonctions sont minérales à l'entretien. Elles sont augmentées avec la production de lait.

Les besoins protéiques chez les bovins sont établis à partir d'une méthode factorielle faisant la somme des besoins d'entretien et des besoins de production. (Synthèse nouvelle de tissus et exportations) (Micol et al .,2003).



### **c. Les besoins en minéraux et en vitamines**

Dans la ration classique, les apports en minéraux oligo-éléments et vitamines constituent souvent une quantité fixe par vache et par jour.

Avec une ration sèche, le complément minéral et vitamine est incorporé dans le concentré.

### **d. Les besoins en eau**

L'eau est utilisée comme véhicule des nutriments vers les tissus, support de la digestion, véhicule de l'excrétion, moyen de rafraîchissement, source de minéraux et comme constituant de base du lait.

Selon (Wolter, 1994), il semble que tout sous-abreuvement entraîne une diminution de la consommation alimentaire et de la reproduction laitières.

## **1.3. Notion de bilan énergétique**

### **1.3.1. Définition**

Grummer (2007) définit le bilan énergétique comme étant la différence entre l'énergie consommée par l'animal et l'énergie requise par celui-ci. L'énergie requise est utilisée pour différentes fonctions comme l'entretien, la croissance, la production laitière et la croissance fœtale.

Si le bilan énergétique est positif (c'est-à-dire que l'énergie apportée à l'animal est supérieure à l'énergie utilisée par celui-ci), on a un stockage de l'énergie en excès sous forme de graisse. En revanche, si le bilan énergétique est négatif (c'est-à-dire que l'énergie apportée à l'animal est inférieure à l'énergie utilisée par celui-ci), on observe une mobilisation des réserves graisseuses comme source d'énergie et donc une perte de poids.

### **1.3.2. Evaluation 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).

## **1.4. Notion de note d'état corporel (NEC)**

La couverture graisseuse de 4 points anatomiques arrière (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

(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.

L'inconvénient de cette technique est sa subjectivité, qui peut être plus ou moins maîtrisée grâce à des critères de notation très précis, un nombre restreint de personnes effectuant ces notations, et la répétition de ces notations (Agabriel *et al.*, 1986).

La notation d'état corporel est donc un outil de choix pour les scientifiques et les éleveurs : outre son faible coût et sa facilité de mise en œuvre, cette technique bien maîtrisée permet une estimation fiable de l'état d'engraissement (Broster & Broster, 1998).

### **1.5. Le statut énergétique, la NEC et la reproduction**

L'énergie a un grand impact sur les performances de reproduction. Elle constitue un aspect de la nutrition dont la gestion présente des défis importants notamment pour les vaches fortes productrices (Brisson, 2003).

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 (Wolter, 1992).

Pour des performances de reproduction satisfaisantes, l'énergie joue des rôles multiples: production d'hormones de la reproduction comme la LH, la progestérone, activité ovarienne, développement des ovocytes. Toutes les précautions prise pour améliorer la consommation de matière sèche en début de lactation aura un effet positif sur la reproduction (Brisson, 2003).

Au cours du post-partum et pendant une durée variable, la vache présente un équilibre 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 (équilibre énergétique négatif) qui affecteraient le délai nécessaire à l'obtention d'une gestation (Hanzen, 2004).

Les effets de l'alimentation en général, et de l'équilibre énergétique en particulier, sur l'activité ovarienne au cours du post-partum sont complexes (Monget, 2004).

Les états de sous-nutrition sont associés à une réduction de la libération de GnRH (*Gonadotrophin Releasing Hormone*) par l'hypothalamus et de la pulsativité des hormones hypophysaires LH (hormone lutéinisante) et FSH (hormone folliculostimulante).

En début de lactation, un équilibre énergétique négatif se traduit par une hypoglycémie et par une hypo-insulinémie qui exercent divers effets sur l'hypothalamus et l'ovaire. Une médiation par l'*Insulin-like Growth Factor* (IGF) des effets de l'équilibre énergétique sur l'activité ovarienne au cours du post-partum est également envisageable, la concentration de ce facteur étant inversement proportionnelle au niveau de production laitière, mais positivement corrélée avec le niveau de déficit énergétique (Monget, 2004).

Le profil de la NEC entre deux vêlage successifs est semblable à une courbe inverse de la lactation chez la vache laitière avec une réduction entre 40 et 100 jours après le vêlage (Roche et al., 2009). La perte d'état observée pendant cette période est le signe d'une mobilisation intense, parfois très rapide, des réserves corporelles. Elle se traduit histologiquement par une diminution de l'épaisseur de la graisse sous-cutanée (Roche et al., 2009).

Selon (Ruegg, 1991), la perte d'état corporel en début de lactation est significativement proportionnelle à l'état d'engraissement au vêlage.

Au cours de la seconde partie de lactation, le retour à un bilan énergétique positif s'accompagnera d'une reprise d'état, traduisant la reconstitution des réserves corporelles (Drame et al., 1999).

## Chapitre II Mobilité spermatique

### 2.1. Anatomie de l'appareil reproducteur de taureau

#### 2.1.1. Description des organes

L'appareil génital mâle est formé par l'ensemble des organes chargés d'élaborer le sperme et de le déposer dans les voies génitales de la femelle où se réalise la fécondation (Barone, 1978).

En général, il comporte trois grandes parties : la section glandulaire, la section tubulaire et le sinus urogénital.

##### 2.1.1.1. Section glandulaire

Elle comprend deux gonades « ou testicules » et les glandes annexes.

###### a. Testicules :

Les testicules sont des organes pairs doués d'une double fonction : la gamétogénèse et la fonction endocrine. La gamétogénèse, ou spermatogénèse, assimilable à une véritable fonction exocrine, est assurée par les tubes séminifères. La fonction endocrine avec la production des hormones mâles.

Chez le taureau, la descente des testicules dans les enveloppes testiculaires s'effectue avant la naissance, vers 3 à 4 mois de gestation (Chenoweth, 1997). Le testicule est pendulaire, à axe vertical et pèse approximativement 500 gramme vers deux ans. Il mesure alors en moyenne 11 à 15 cm de haut sur 7 à 9 cm de large, et 7 à 9 cm d'épaisseur pour une circonférence scrotale de 35 cm (Setchell, 1991).

Le testicule est protégé par des enveloppes superposées et d'origine très différentes, en surface se trouve le scrotum et en profondeur se trouve le muscle crémaster (Vaissaire, 1977 ; Barone, 1978 ; Bonnes et al. 2005).

###### b. Glandes annexes :

Les sécrétions des glandes annexes participent à la formation du plasma séminal et représentent 50 à 95% du volume total du plasma séminal. Les glandes les plus actives sont les vésicules séminales, la prostate et les glandes de Cowper (aussi appelées glandes bulbouretrales) (Charles T et Levasseur M.C, 2001).

##### 2.1.1.2. Section tubulaire :

Constituée par l'épididyme, et le canal déférent.

###### a. Epididyme :

C'est un organe plaqué sur l'arrière du testicule, d'une longueur de 60 m, reliant les canaux efférents (à la sortie du testicule) au canal déférent.

Ce tube contourné qui forme des lobules séparées par des travées conjonctives présente trois grands segments anatomiques : la région antérieures ou tête, la région médiane ou corps et la région postérieure (caudale) ou queue (Dacheux Fet Dacheux J.L. 2001 ; Bonnes et al.,

2005). L'épithélium du tube épидидymaire est constitué de deux couches de cellules : des petites cellules basales et de grandes cellules principales présentant de nombreuses microvillosités.

Dans cet organe, les spermatozoïdes continuent à se transformer en subissant plusieurs modifications métaboliques avec diminution de la synthèse des lipides (les spermatozoïdes perdent 40% de leurs phospholipides au cours du transit), augmentation du métabolisme oxydatif, glycolytique, pour assurer certaines fonctions dont l'essentiel est de transporter les spermatozoïdes vers le système éjaculateur (Charles T et Levasseur M.C, 2001).

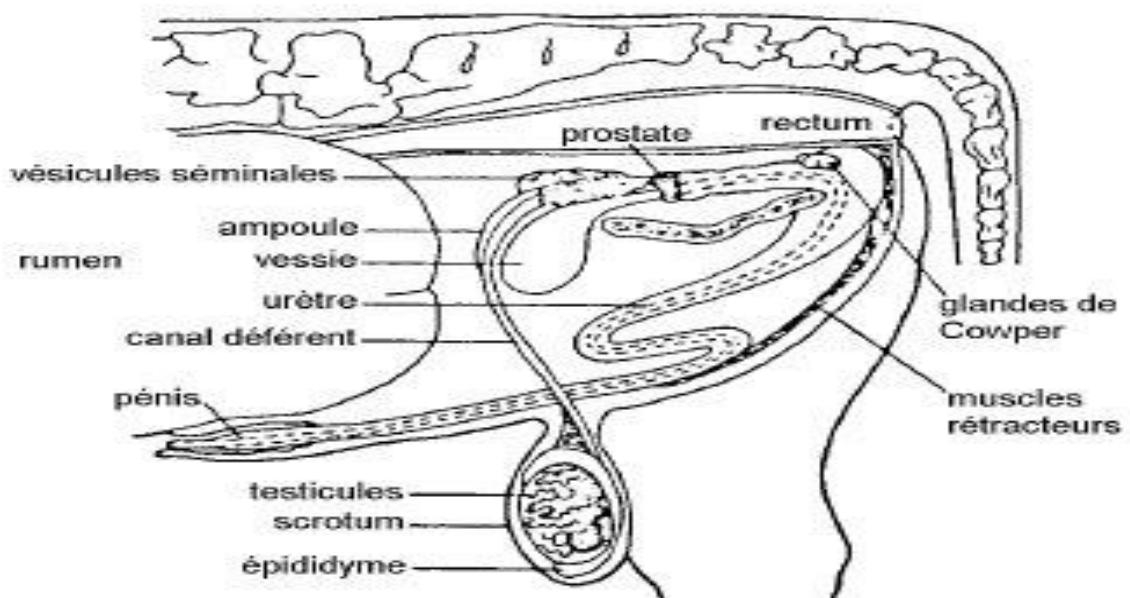
## b. Canal déférent

La queue de l'épididyme se poursuit par le canal déférent qui fait suite au canal épидидymaire. D'abord contourné, il devient droit en franchissant l'anneau inguinal et rejoint la cavité abdominale. Chaque canal atteint la face dorsale de la vessie formant un très léger renflement pelvien avant de se jeter dans l'urètre (Barone, 1978 ; Bonnes et *al.*2005).

### 2.1.1.3. Sinus uro-génital

Comprenant l'urètre et l'appareil copulateur « le pénis ».

Le pénis du taureau est de type fibro-élastique, pauvre en tissu érectile. Les corps caverneux sont volumineux et presque entièrement confondus. Ils sont également pourvus d'une albuginée très épaisse. Le pénis s'avance très loin, sous le ventre et le prépuce atteint le voisinage immédiat de l'ombilic. Le corps spongieux du gland est très peu développé. Ce dernier présente une forme très asymétrique ; il est incurvé en crochet vers la gauche et l'ostium externe de l'urètre est porté par un processus urétral (Barone 2001).



**Figure n°1** : Appareil génital du taureau (Constantinesca, 2004).

## 2.2. Méthodes de récolte du sperme

La récolte du sperme est un procédé par lequel on obtient le sperme sur l'animal vivant ou mort. Il existe plusieurs méthodes de récolte du sperme. Parmi les méthodes les plus couramment utilisées, la récolte au vagin artificiel et l'électro-éjaculation (sur animaux vivants) et les techniques de collecte du sperme épидidymaire (post-mortem).

### 2.2.1. Récolte au vagin artificiel

La récolte au vagin artificiel est la méthode la plus couramment utilisée sur le terrain. Le vagin artificiel simule les conditions naturelles offertes par le vagin de la vache. Le principe est de rassembler dans un appareil simple et pratique les conditions naturelles présentées par les voies génitales de la vache au moment du coït et de recueillir rapidement un éjaculat total et non souillé (Derivaux, 1971). Le vagin artificiel est un assemblage de quatre pièces (Figure n°2) :

- Le corps du vagin (manchon cylindrique rigide) muni d'un orifice à valve par lequel on peut introduire de l'eau tiède ou l'air : 35 cm de longueur et 7,5 cm de largeur ;
- le manchon interne en caoutchouc souple. Entre le manchon et le corps, la température de l'eau et la pression de l'air sont réglées à 38°C ;
- Le cône : permet de relier le corps du vagin artificiel au tube gradué ;
- le tube gradué pour l'appréciation de la quantité de sperme récoltée

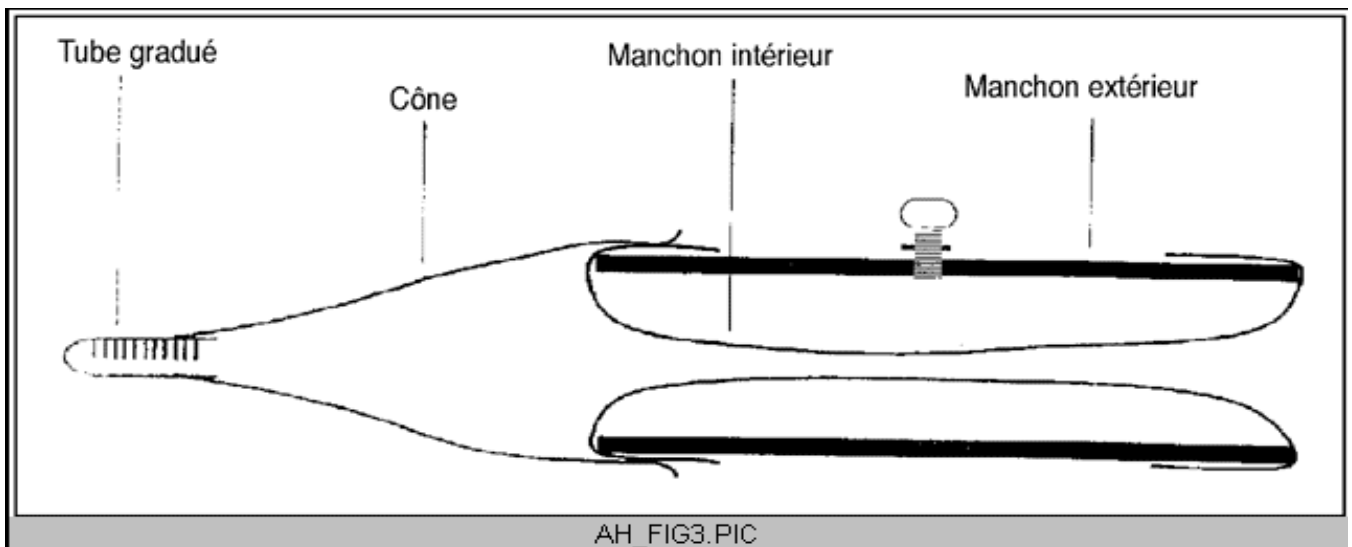


Figure n°2 : Schéma du vagin artificiel (Barret, 1992).

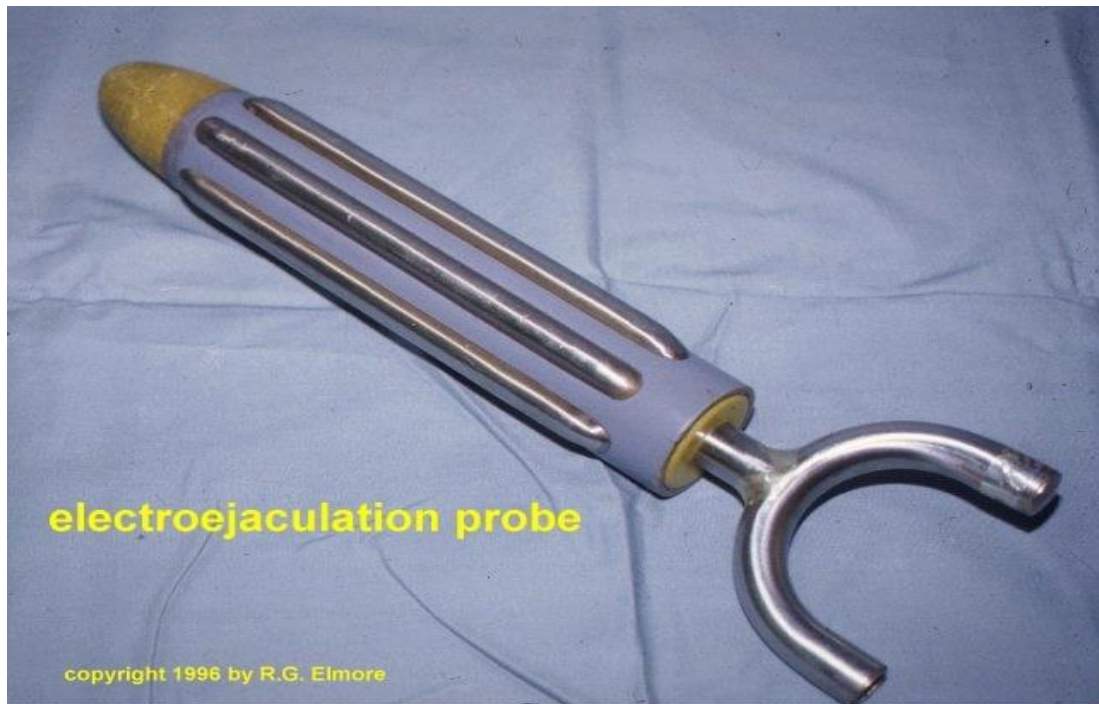
### 2.2.2. Electro-éjaculation

L'électro-éjaculation s'accomplit par stimulation électrique des muscles lisses de l'ampoule et du canal déférent à l'aide d'une sonde intra-rectale et d'une source électrique avec contrôle de la tension. Elle permet d'obtenir le prélèvement de sperme à partir du taureau sans intervention des mécanismes normaux, sensoriels et psychiques de l'éjaculation.

Après contention de l'animal, l'électrode lubrifiée est introduite dans son rectum vidé au préalable. Puis, une série de stimulations répétées est appliquée au rectum, en augmentant

progressivement l'intensité selon les instructions du fabricant jusqu'à l'érection complète et l'éjaculation de l'animal. Le sperme est recueilli par un appareil de récolte.

Les éjaculats recueillis par électro-éjaculation sont généralement d'un volume plus important et d'une concentration plus faible en spermatozoïdes que ceux recueillis par le vagin artificiel (Salisbury Et Vandermark, 1961). Cependant, le nombre total de spermatozoïdes, le pouvoir fertilisant et l'aptitude à la congélation ne semblent pas être affectés. L'utilisation de l'électro-éjaculation même durant une longue période (plus d'une année) n'a aucun effet néfaste sur la santé et sur la fertilité de l'animal (Haskouri, 2001).



**Figure n°3 :** Sonde de l'électro-éjaculateur.

### **2.2.3. Massage transrectal**

Le massage transrectal du tractus génital interne a été proposé comme méthode chez le taureau. Cette méthode est indiquée pour des animaux présentant des lésions de l'appareil locomoteur. Si au bout de 2 à 3 minutes, aucun résultat n'est obtenu, il faut envisager une autre méthode (Hanzan, 2008).

### **2.2.4. Technique de récolte de sperme épидидymaire**

On peut prélever du sperme épидидymaire d'un animal vivant sous anesthésie général avec une intervention chirurgicale. Le principe consiste à faire une microponction du canal déférent en lui introduisant un petit tube et permettre à son extrémité d'avancer à l'extérieur à travers le scrotum pour la collecte du sperme dans une petite fiole (Deutshier et *al.* 1974)

Comme on peut aussi procéder à une collecte post-mortem à partir d'un animal mort. Trois méthodes principales de récupération de sperme épидидymaire post-mortem ont été adoptées dans différentes espèces domestique et sauvages :

### a. Méthode de découpage « cutting-method »

Cette technique consiste à réaliser plusieurs coupes avec une lame sur la partie caudale de l'épididyme et le fluide spermatique émergent des tubules est rassemblé (Kaabi et *al.* 2003).

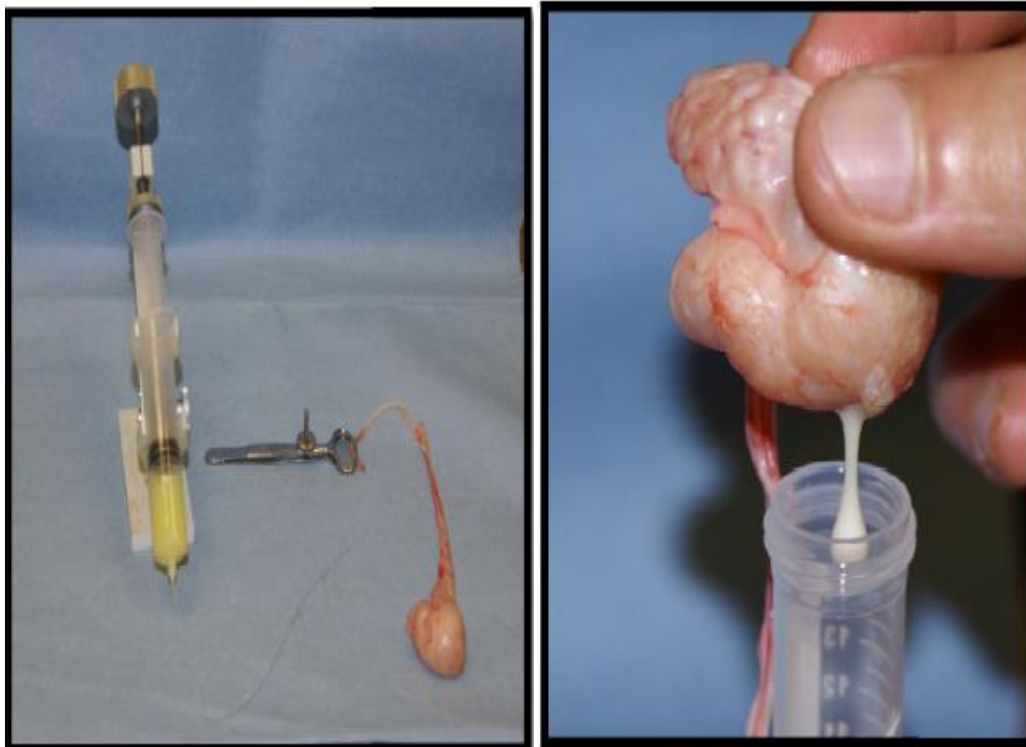
### b. méthode « float-up »

Cette méthode consiste à inciser la partie caudale de l'épididyme et du canal déférent avec un scalpel dans une boîte de pétri, lavé avec 2,5 ml de solution (alcool à 70) chauffée à 37°C et ensuite transférée dans une deuxième boîte de pétri et lavé encore avec 2,5 ml de la même solution (alcool à 70°). La suspension de sperme obtenue à partir des deux étapes de lavage est filtrée à travers une passoire inoxydable de 200 µm et rassemblée dans un tube en verre (Cary et *al.*, 2004).

### c. Méthode « retrograde-flushing »

La méthode de rinçage rétrograde consiste à isoler les parties caudales et les canaux déférents du reste de l'épididyme en faisant une coupe avec un scalpel près de la jonction du corps et de la partie caudale proximale. Ensuite une aiguille est introduite dans la lumière du canal déférent. Le fluide spermatique est alors rincé avec une seringue chargée avec 4 ml d'une solution isotonique chauffée à 37°C dans une direction rétrograde en allant du canal déférent vers la partie caudal (Martinez-pastor et *al.*,2006).

Le retrograde-flushing a été utilisé chez plusieurs espèces, l'étalon (Cary et *al.*,2004), le cerf (Martinez-pastor et *al.*,2006), et le taureau (Turri et *al.*,2011). Cette méthode semble donner de meilleurs résultats quand elle est comparée au « float-up » et à la méthode « cutting » (Martinez-pastor et *al.*,2006).



**Figure n°4** : collecte de sperme avec la méthode « retrograde-flushing » (Stout.2012)



## **2.3. Évaluation de la qualité du sperme**

L'évaluation de la qualité du sperme a pour objectif d'apprécier ses caractéristiques afin de définir le niveau possible de sa dilution. Elle permet ainsi de préparer une semence correspondant à l'optimum biologique et économique recherché. Elle comporte des examens macroscopiques, microscopiques, physico-chimiques et biochimiques.

### **2.3.1. Analyse macroscopiques**

Ils ont pour but d'apprécier le volume de l'éjaculat, sa couleur et sa viscosité :

#### **a. Volume de l'éjaculat**

Le volume de l'éjaculat est lu sur le tube de collecte gradué. Ce volume varie de 0,5 à 14 ml, en fonction de l'âge, la race, l'alimentation, l'état de santé, les conditions de récolte ainsi que de la fréquence de récolte. Le volume moyen est de 6 ml chez un taureau adulte, tandis qu'il est de l'ordre de 2 ml chez le jeune (Kabera, 2008).

#### **b. Couleur du sperme**

Chez le taureau, la couleur normale du sperme est, dans la plupart des cas, ivoire-crème, blanc-laiteux ou blanc-jaunâtre (en fonction de la concentration de spermatozoïdes).

La couleur de l'éjaculat peut varier du blanc clair au jaune brillant (Ezekwe, 1988). L'aspect est généralement homogène et crémeux (Djabakou *et al.* 1984).

Le sperme pathologique peut avoir, selon les cas, une couleur brunâtre, rosée, bleuâtre, jaunâtre, rougeâtre ou grisâtre.

#### **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 spermatozoïde est élevé. Comparée à l'eau distillée, la viscosité du sperme de taureau est de 3,7. Elle dépend également de sa conductibilité électrique c'est-à-dire de sa concentration en ions (Hanzen, 2008).

#### **d. PH**

Le mesure du PH (PH-mètre, papier indicateur) doit être immédiate, le sperme s'acidifiant rapidement étant donné la formation d'acide lactique. Sa valeur normale doit être comprise entre 6,5 et 6,8.

### **2.3.2. Examens microscopiques**

Ils comportent l'évaluation de la motilité, de la concentration, de la viabilité et de la morphologie des spermatozoïdes.

#### **a. Motilité (évaluation subjective)**

C'est un élément d'appréciation de la vie ou de la mort des spermatozoïdes et de leur niveau de vivacité. Elle peut porter sur la semence globale après récolte (motilité massale et motilité individuelle) ou sur la semence diluée en s'intéressant aux spermatozoïdes individualisés (motilité individuelle).

– **Motilité massale**

Elle s’apprécie au microscope au grossissement x10. A l’examen microscopique d’une goutte de sperme non diluée, l’observateur s’intéresse aux mouvements et à l’effet du déplacement des spermatozoïdes dans le liquide séminal. A l’issue de l’observation, en fonction du mouvement de masse des spermatozoïdes, une note de 0 à 5 est attribuée à chaque éjaculat. Certains auteurs convertissent cette note en pourcentage fictif de spermatozoïdes mobiles. L’exigence minimale pour un éjaculat correspond à un bon mouvement de masse qui doit être tourbillonnant [une note supérieure à 3 (environ 60% de spermatozoïdes mobiles)] (Tableau I).

**Tableau N°1** : Note attribuées aux éjaculats suivant leur motilité massale (Source : Présentation de la coopérative de l’AIGLE. <http://www.cia-laigle.com/laboratoire.htm>, page consulté le 12 Septembre 2007)

Note		1	2	3	4	5
% de Spermatozoïdes mobiles	%	envir on 20%	envir on 40%	envir on 60%	envir on 80%	Prés de 100%

– **Motilité individuelle**

Elle s’apprécie au microscope au grossissement x40. C’est l’appréciation du mouvement des spermatozoïdes par leur déplacement à travers le champ microscopique. Les mouvements normaux des spermatozoïdes sont oscillatoires et progressifs. Ce test se réalise sur du sperme dilué à 1/10 de sérum physiologique. Il permet de déterminer approximativement le taux de spermatozoïdes vivants et d’affecter au sperme une note allant de 0 à 5 (Tableau n°2). Un bon sperme doit avoir au moins 60 à 70 % de spermatozoïdes vivants.

**Tableau N°2** : Notes attribuées aux éjaculats suivant leur motilité individuelle dans une grille de notation de 0 à 5.

Critères	Notes
Absence de spermatozoïdes: azoospermie	0
Absence de spermatozoïdes vivants: spermatozoïdes morts (absence de mobilité)	1
25% de spermatozoïdes vivants	2
60% spermatozoïdes vivants	3
80% spermatozoïdes vivants	4
100% spermatozoïdes vivants	5

**b. Concentration du sperme**

Elle peut être déterminée par :

- Comptage direct des spermatozoïdes en utilisant la cellule de THOMA sur du sperme dilué à 3% de Na Cl ;
- L’utilisation de la densité optique ;
- L’utilisation de compteur électronique ;

- La détermination du volume cellulaire par centrifugation.

Après comptage des spermatozoïdes, en utilisant la cellule de THOMA, le nombre de spermatozoïdes est déterminé par la formule suivante :  $C=N \times 4 \times 10 \times d$ , avec :

- N : le nombre de spermatozoïdes (sptz) 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: taux de dilution.

Le bon sperme a une concentration supérieure à  $0,5.10^9$  spermatozoïdes/ml (Kabera, 2008).

### c. Évaluation objective de la mobilité

#### **Le système CASA (Computer Assisted Sperm Analysis)**

Les méthodes conventionnelles d'analyse du sperme, y compris l'évaluation de la mobilité sont subjectives. La mobilité massale et la notation progressive du sperme sont communes dans l'analyse de routine du sperme dans la plupart des cliniques d'andrologie (Yeung *et al*, 1997). L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) suggère quatre grades (A), progression rapide ; (B), progression lente ; (C), mobile mais non progressive ; (D), immobile (Who, 2010), toutefois, de grandes variations ont été décrites dans l'estimation subjective de la mobilité spermatique, aussi bien pour l'évaluation du même éjaculat (Contri *et al.*, 2010).

Pour une meilleure précision et objectivité de résultat, le système CASA a vu le jour : le premier fût proposé par DOTT et FOSTER il y a 44 ans. Maintenant, il s'est généralisé et est utilisé dans plusieurs centres d'andrologie humaine et vétérinaire. Les images obtenues permettent l'analyse de plusieurs paramètres dont la concentration du sperme, la mobilité spermatique et certains paramètres morphologiques en particulier de la tête du spermatozoïde (Verstegen *et al.*, 2002).

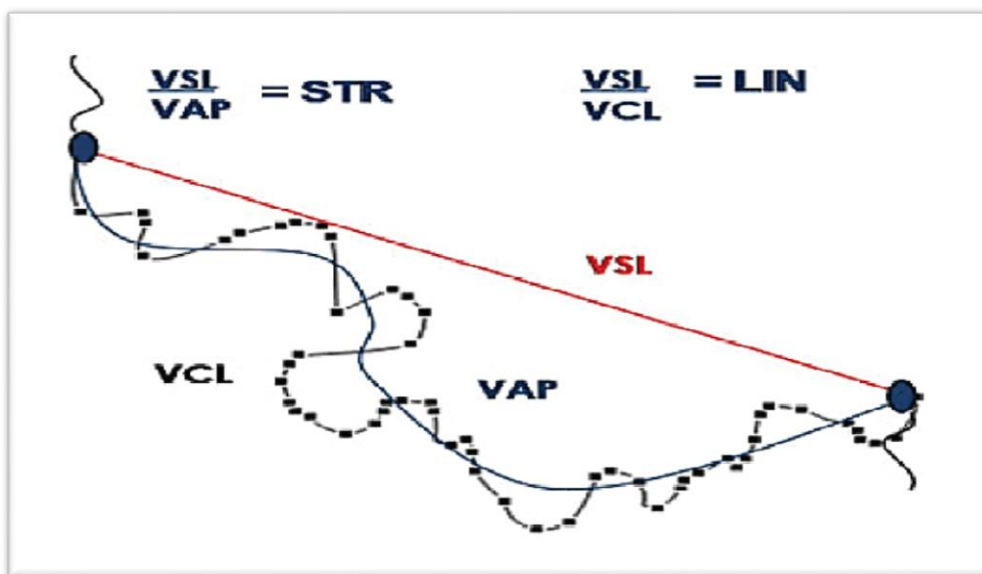
Le principal avantage de CASA est qu'il permet une analyse objective de la mobilité des spermatozoïdes dans les échantillons, la disponibilité des données enregistré par CASA facilite la comparaison des résultats et permet de trouver des différences subtiles entre les mâles ou les traitements (Verstegen *et al.*, 2002), en outre, les systèmes CASA semblent avoir une grande précision et répétabilité (Davis *et al.*, 1992).

L'analyse du sperme assisté par ordinateur fournit les moyens pour une classification objective d'une population de spermatozoïde. En utilisant des images numériques du trajet de chaque spermatozoïde, la machine CASA est capable d'analyser, par des algorithmes de traitement, les propriétés du mouvement des spermatozoïdes. Les paramètres fréquemment rapportés par CASA comprennent :

- La vitesse curviligne (VCL) qui est la vitesse moyenne mesurée sur la piste réelle suivi par la cellule point par point en micromètres par seconde ;
- L'amplitude de mouvement latéral de la tête des spermatozoïdes pendant leur déplacement (ALH : amplitude of latéral Heat Displacement),
- La fréquence de battement de la tête (BCF) qui est la fréquence à laquelle la tête du spermatozoïde croise l'axe médiane de déplacement en Hertz,

- La vitesse moyenne de trajectoire (VAP) qui correspond à la vitesse moyenne du parcours de la cellule lisse en micromètres par seconde,
- La vitesse linéaire (VSL) ou rectiligne qui représente la vitesse moyenne mesurée en ligne droite entre le début et la fin d'une piste en micromètres par seconde,
- La rectitude (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 droite à 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). (figure5)

Ces paramètres CASA ont été modélisés et raffinés mathématiquement pour décrire au mieux les paramètres de mouvement de chaque spermatozoïde qui se déplace à travers un champ microscopique (Boyer et *al.*1989).



**Figure N°5** : représentation schématique des différents paramètres mesurés par CASA : VSL : vitesse linéaire, VCL : vitesse curviligne, VAP : vitesse moyenne de la trajectoire, STR : la rectitude, LIN : linéarité. (Source: casa-scopus.com).

## **Chapitre 3 Le stress oxydatif**

### **3.1. Stress oxydatif**

L'oxygène est un gaz indispensable à la vie. Il est normalement transformé en molécules d'eau au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale. Ce processus mitochondrial n'est toutefois pas parfait, car 2 à 5 % de l'oxygène sont transformés en espèces réactives oxygénées (ERO) (Cadenas et Davies, 2000 ; Pincemail et coll., 2001).

Il a été montré que le stress oxydant était à l'origine de nombreuses pathologies chez les animaux de rente (rétention placentaire, mammites chez la vache laitière). Ce stress serait maximum lors de périodes clés de la vie des animaux : gestation, mise-bas et période néonatale mais aussi périodes de finition ou de forte production. D'autres facteurs comme les états infectieux ou inflammatoires, des conditions environnementales particulières (froid, chaleur intense, confinement) sont également à l'origine d'une production accrue d'ERO.

Toutes ces altérations provoquées par le stress oxydant sont à l'origine de nombreuses pathologies. C'est pourquoi, l'évaluation du stress oxydant apparaît comme une nécessité (Durand et *al.*, 2013)

#### **3.1.1. Définition**

Dans les systèmes biologiques, le stress oxydatif se définit comme un déséquilibre de la balance oxydants/antioxydants en faveur des oxydants, entraînant des dommages cellulaires (Atamer et *al.*, 2008).

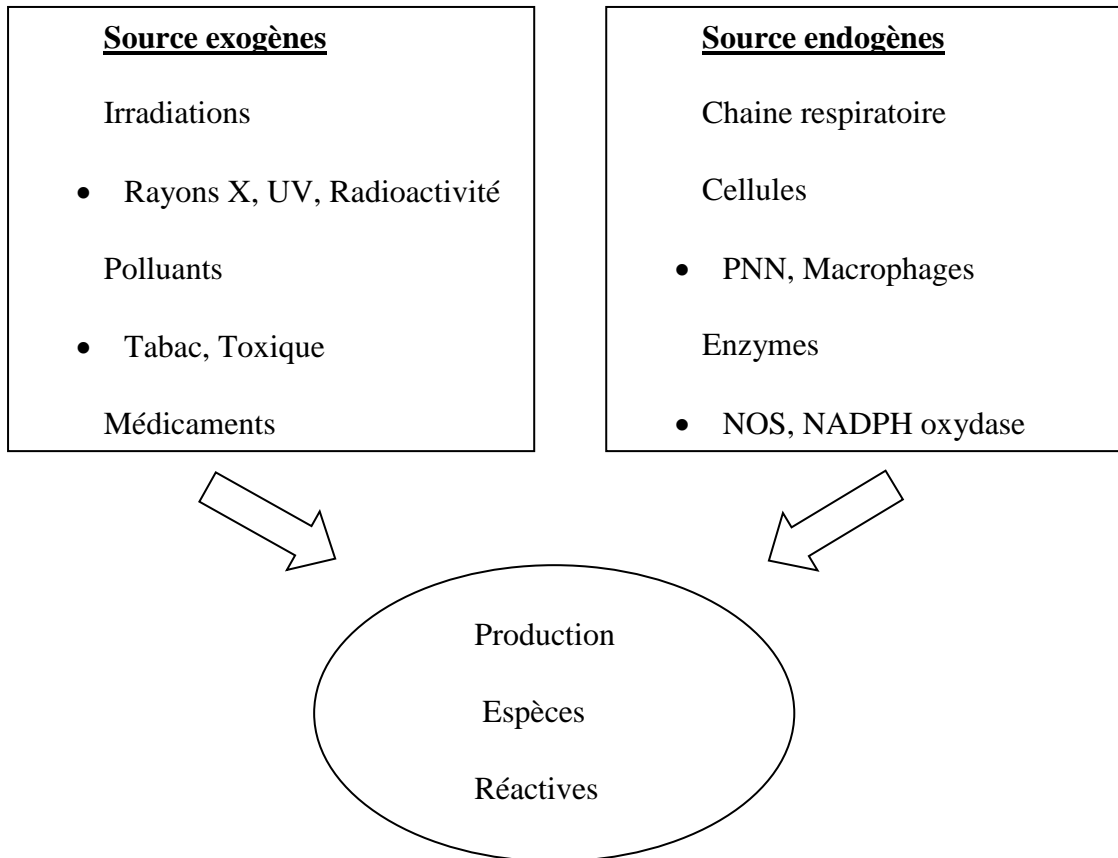
#### **3.1.2. Les espèces réactives de l'oxygène (EROs)**

Les radicaux libres sont des espèces chimiques (atomes ou molécules) possédant au moins un électron célibataire (ou non apparié) sur leur couche externe, et sont en général très réactifs et instables (Gilbert, 2000).

Les radicaux libres peuvent engendrer des dommages importants sur la structure et le métabolisme cellulaire en dégradant de nombreuses cibles : protéines, lipides et acide nucléiques (Angelos et *al.*, 2005).

##### **3.1.2.1. Origine des radicaux libres (RL)**

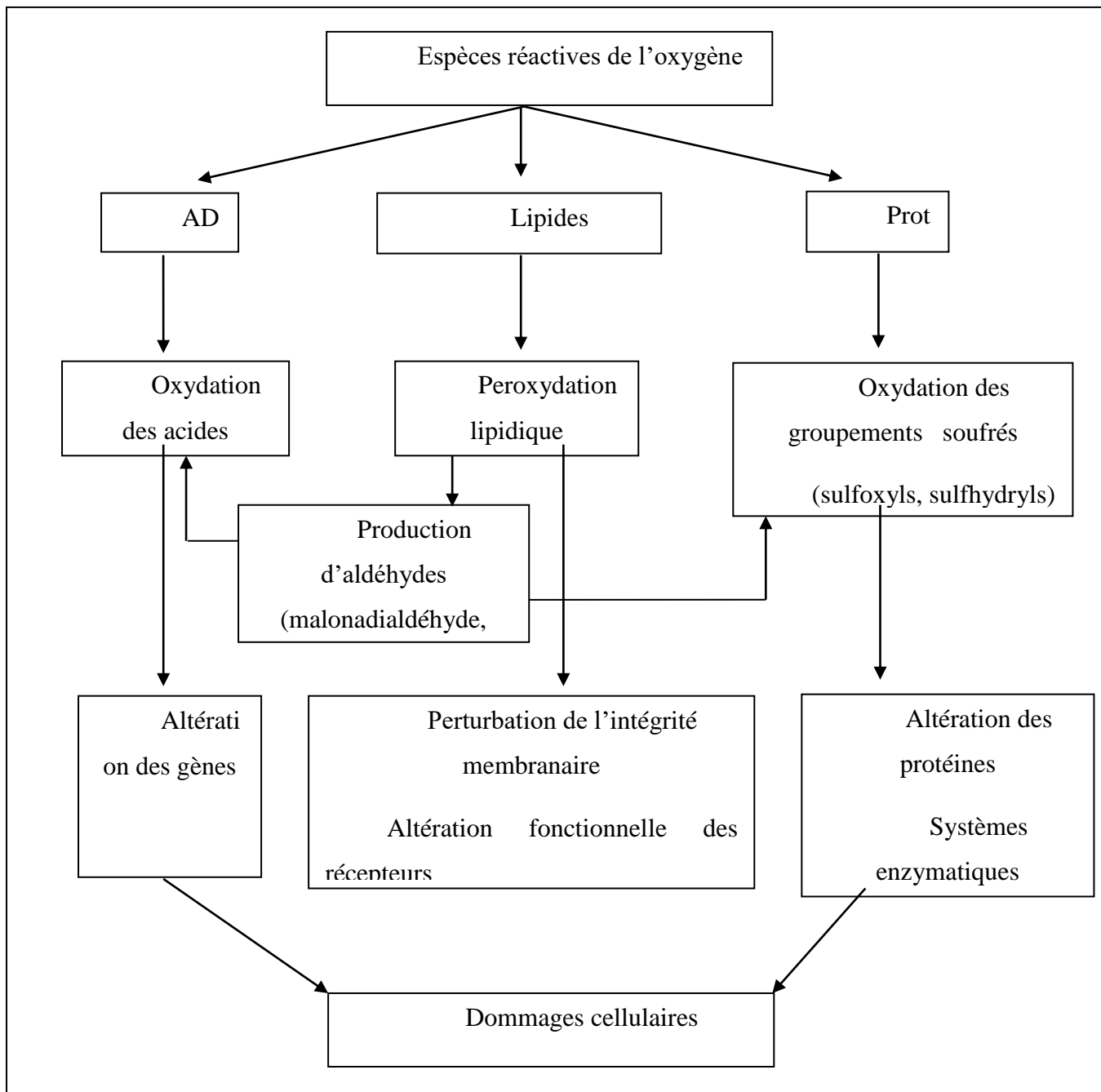
La production d'ER peut être soit d'origine endogène soit due à des facteurs exogènes tels que les métaux lourds, les rayonnements ionisants et les rayons ultra-violet, les polluants atmosphériques tels que la fumée de cigarette mais également des médicaments (paracétamol, anthracyclines...) (Figure 6).



**Figure n° 6 :** Les origines des espèces réactives (Migdal et *al.*,2011)

### 3.1.3. Les cibles biologiques du stress oxydant

En raison de leur grande réactivité, les EROs peuvent s'attaquer à de nombreuses cibles biologiques dont les lipides, les protéines et les acides nucléiques comme le montre la (Figure 7).



**Figure n°7 :** Les différentes cibles des Espèces Réactives de l'Oxygène (d'après Monteil 2004).

### 3.1.3.1. Les lipides

Les lipides et principalement leurs acides gras polyinsaturés sont la cible privilégiée de l'attaque par le radical hydroxyle capable d'arracher un hydrogène sur les carbones situés entre deux doubles liaisons, pour former un radical diène conjugué, oxydé en radical pyroxyde. Cette réaction appelée *peroxydation lipidique* donne une réaction en chaîne (Beckman & Ames, 1998; Valko et al., 2006).

### **3.1.3.2. Les acides nucléiques ADN**

Les ERs, et plus particulièrement le radical hydroxyle ( $\text{HO}^\circ$ ), peuvent induire des cassures de l'ADN, des mutations ponctuelles (simple ou double brins) ou bien altérer les systèmes de réparation. Les EROs peuvent induire notamment des oxydations, des nitrations ou des méthylations des bases. Parmi les oxydations des bases, la guanine peut être oxydée par le radical hydroxyle en 8-hydroxy-Guanosine (8-OH-G) aboutissant à la formation de 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OH-dG) qui peut être ensuite mesuré comme marqueur de stress oxydant (Valko *et al.* 2006).

### **3.1.3.3. Les protéines**

Les protéines comportant un pont sulfhydrique sont les plus sensibles aux attaques radicalaires, c'est le cas de nombreuses enzymes antioxydantes et les protéines de transport, qui contiennent très souvent des groupements thiols (SH) (Sen, 2001).

Les protéines modifiées par l'oxydation, vont être prises en charge par des protéines spécifiques dites protéines de stress (Heat Shock Protein, HSP) connues pour leur rôle cytoprotecteur, où elles prennent en charge les protéines dénaturées et participent à la restauration de la fonction de ces protéines (Welch, 1992).

## **3.2. Les antioxydants**

### **3.2.1. Définition**

Un antioxydant peut être défini comme toute substance qui est capable, a concentration relativement faible, d'entrer en compétition avec d'autres substrats oxydables et ainsi retarder ou empêcher l'oxydation des ces substrats.

### **3.2.2. Antioxydants enzymatiques**

Ce système est principalement composé des superoxydes dismutases (SOD), des catalases (CAT), des glutathions peroxydases (GPx) et des thiorédoxines (Higashi *et al.*, 2009 ; Wood *et al.*, 2003).

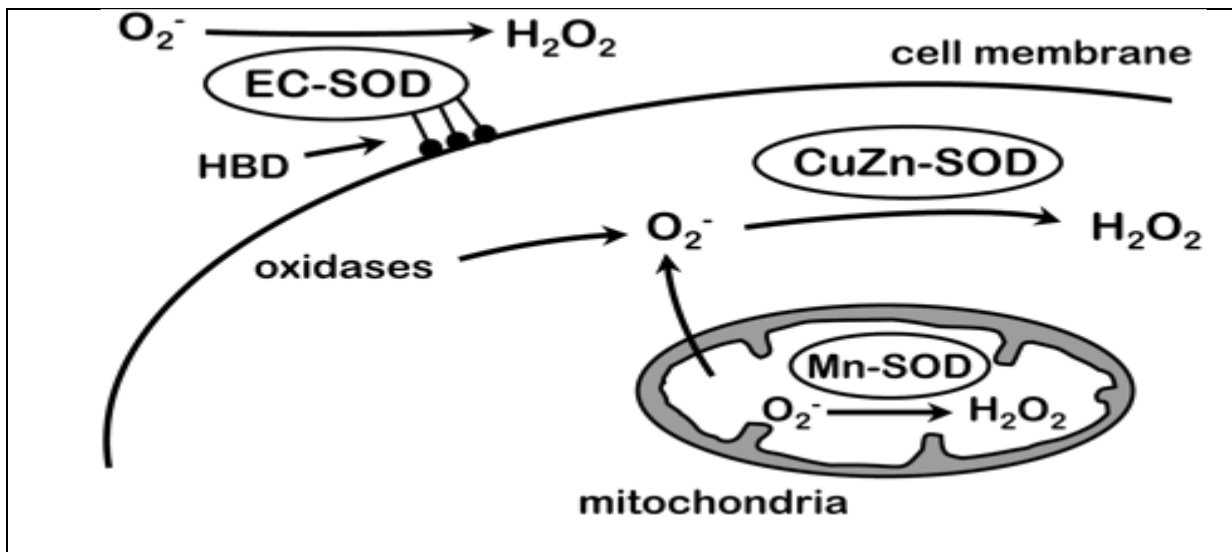
#### **3.2.2.1. Les superoxydes dismutases**

La famille des superoxyde-dismutases comporte trois isoformes (SOD1, SOD2, SOD3) dont le rôle est la dismutation de deux anions superoxyde en espèces oxygénées moins réactives que sont  $\text{H}_2\text{O}_2$  et  $\text{O}_2$  (Antwerpen, 2006).

- (Cu, Zn SOD ou SOD1) La SOD1 est présente majoritairement au niveau cytoplasmique ;
- (Mn SOD ou SOD2) La SOD2 est exclusivement retrouvée dans les mitochondries ;



- (SOD3 ou EC-SOD) Elle est préférentiellement retrouvée dans la matrice extracellulaire des tissus.

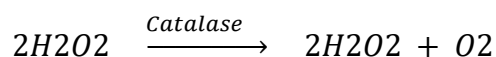


**Figure n°8:** Les trois types de SOD (Frank et *al.*2004).

### 3.2.2.2. La catalase

Elle réduit le peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$  en libérant de l'oxygène et de l'eau.

Elle est localisée surtout dans les peroxysomes. Elle n'élimine pas la totalité du peroxyde d'hydrogène, mais son rôle est très important surtout en présence d'ions ferreux (Lindau-Sehpard et Shaffer, 1993).



### 3.2.2.3. La Glutathion Peroxydase

Son rôle principal est d'assurer la réduction du peroxyde d'hydrogène ou des peroxydes lipidiques formés suite à l'effet du stress oxydant (Zhu et *al.* 2008).

### 3.2.2.4 La glutathion réductase

Le rôle de la glutathion réductase est de régénérer la glutathion peroxydase. Dans le cadre de cette réaction, la glutathion-réductase utilise un cofacteur le NAPH. La glutathion-réductase se trouve dans le cytosol et dans les mitochondries où se trouve du glutathion-peroxydase (Garait, 2006).

### **3.2.3. Les antioxydants non enzymatiques**

Contrairement aux enzymes antioxydantes, la plupart des antioxydants non enzymatiques ne sont pas synthétisés par l'organisme et doivent être apportés par l'alimentation (Vertuani, S *et al.*, 2004).

#### **3.2.3.1. Vitamine E**

Sous le terme vitamine E est regroupée la famille des tocophérols ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$ ). Le caractère hydrophobe de la vitamine E lui permet de s'insérer au sein des acides gras de la membrane cellulaire et des lipoprotéines, où elle joue un rôle protecteur en empêchant la propagation de la peroxydation lipidique induite par un stress oxydant (Vertuani *et al.*, 2004).

#### **3.2.3.2. La vitamine A**

Ce terme regroupe les rétinoïdes et les provitamines A aussi appelés caroténoïdes. Les caroténoïdes sont de puissants agents antiradicalaires qui neutralisent tant des espèces électriquement que chimiquement actives. Ils ont également un rôle de protection vis-à-vis des réactions de photosensibilisation. En fonction de la concentration en caroténoïdes, leurs effets sont différents: à faible concentration, ils ont une action anti-oxydante alors qu'à plus forte concentration, ils se comportent comme des agents pro-oxydants (Valko *et al.* 2006).

#### **3.2.3.3. La vitamine C**

La vitamine C (ou acide ascorbique) n'est pas synthétisée par l'organisme. Elle est hydrosoluble à la concentration physiologique. Lors de son oxydation en acide déhydroascorbique, elle passe par une forme radicalaire intermédiaire (radical ascorbyl) qui joue un rôle essentiel dans la régénération de la vitamine E oxydée (Chen *et al.*, 2000).

### **3.3. Évaluation du stress oxydatif**

Le statut oxydatif est évalué par la mesure d'un groupe de marqueurs. Ces marqueurs sont 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 (Shacter, 2000; Dalle-Donne *et al.*, 2006; Ahmad *et al.*, 2008).

#### **3.3.1. Evaluation de l'oxydation lipidique**

Chez les mammifères, la membrane plasmique des spermatozoïdes est nettement différente de celle des cellules somatiques en ce qui concerne sa composition lipidique. Elle contient des niveaux élevés d'acides gras polyinsaturés. Ces lipides sont responsables de la

fluidité des membranes (Sanoka et Kurpisz, 2004). Lorsque les niveaux de ROS sont élevés, ils dégradent les acides gras polyinsaturés, provoquant une cascade de réactions chimiques aboutissant à la peroxydation des lipides. La peroxydation des lipides dans le sperme peut entraîner une destruction de près de 60 % des acides gras, d'où une altération des propriétés membranaires du spermatozoïde (Jones et al.,1979).

La détection spectrophotométrique de la malonedialdéhyde (MDA) par le test à l'acide thiobarbiturique (TBA) est la méthode la plus ancienne et la plus populaire pour mesurer la peroxydation lipidique (Fukunaga et al.,1998).

La réaction de l'acide thiobarbiturique avec la MDA permet la formation d'un chromophore rouge mesurable à 532 nm (Sato 1978). Les niveaux élevés de MDA séminal représentent des taux accrus de peroxydation des lipides qui diminuent la fertilité (Agarwal et al.,2003 ;Tavilani et al.,2005).

### **3.3.2. Activité antioxydante**

Les spermatozoïdes ont une faible activité transcriptionnelle et un volume cytoplasmique limité. Ils sont dans l'incapacité de répondre à un SO en produisant de novo des anti- oxydants ou en réparant le matériel cellulaire altéré. Même si certains antioxydants sont présents dans les spermatozoïdes, le liquide séminal est la meilleure protection des gamètes contre les ROS. Lorsque les ROS surpassent les systèmes de défense antioxydants et perturbent l'équilibre complexe entre ROS et antioxydants, les anomalies pathologiques se produisent selon la nature, la quantité des ROS et la durée de leur impact. Leurs conséquences sont la dégradation de lipides, de protéines, et de l'ADN (Sanoka et Kurpisz, 2004).

Plusieurs techniques sont utilisées pour évaluer l'activité antioxydante. Ces techniques, notamment en *in vitro*, sont basées essentiellement sur l'emploi de réactifs chimiques synthétiques comme l'ABTS. Il existe peu de tests *in vitro* basés sur des biomolécules, un nouveau test utilisant l'hémoglobine comme molécule indicatrice de l'état oxydatif (Rizvi & Pandey, 2010).

#### **a. Test ABTS**

La méthode fiable pour déterminer les capacités de piégeage des radicaux implique la mesure de la disparition des radicaux libres L'essai ABTS est l'une des stratégies d'analyse les plus fréquemment utilisés pour l'activité antioxydant (Bellik, 2014).

La procédure basée sur l'inhibition de la production de l'ABTS radical cation avec un maximum d'absorption à 342 nm (Antolovich et al.,2001).

## **b. Détermination de l'activité enzymatique antioxydante catalase**

L'activité de la catalase est mesurée au niveau du lysat par analyse spectrophotométrique de taux de la décomposition du peroxyde d'hydrogène notamment par la méthode d'Aebi (1974). Le principe est basé sur la décomposition du peroxyde d'hydrogène conduit à une diminution de l'absorption de la solution de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en fonction du temps.

### **3.4. Le test à hémoglobine**

L'hémoglobine (Hb) est l'une des protéines héminiques la plus spécialisée et la plus répondeuse ; plus de 95% des protéines du cytoplasme des hématies est représenté par l'Hb (Çimen, 2008). Il est connu que la réaction prolongée de l'Hb avec le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, mène aussi bien à la destruction de l'Hb *in vitro* qu'*in vivo* (Giulivi & Daviess, 1990).

Le test de la stabilité de l'hémoglobine peut être utilisé comme moyen d'évaluation du statut oxydatif, en utilisant une molécule biologique (Hb) à la place de molécules chimiques (ABTS, TBA, ...).

Brièvement, 100 µl de surnageant (hémolysât) est ajouté à 100 µl des suspensions d'hémoglobine et le mélange est incubé pendant 30 minutes à 37° C, La diminution de l'absorbance à 412 nm représente le degré de dégradation de l'hémoglobine. L'activité antioxydante est déterminée directement en mesurant la densité optique à 412 (Bellik, 2015).

## 1. Matériel et méthodes

Notre travail consiste à étudier l'effet du plasma sanguin prélevé de vaches de différents états corporels sur la mobilité et le statut oxydatif des spermatozoïdes échez les bovins. Notre expérimentation a été réalisée dans le laboratoire d'écologie animale au niveau de l'université Abderrahmane Mira de Bejaia.

### 1.1. Matériels

#### 1.1.1. Matériels biologiques

##### 1.1.1.1. Le sperme épидидymaire bovin

Le sperme épидидymaire a été recueilli sur des testicules des taureaux récupérés au niveau de l'abattoir de Bejaia tôt le matin juste après l'abattage puis transportés au laboratoire à une température ambiante. La semence contenue dans la région caudale de l'épididyme a été récupéré à l'aide de la méthode de rinçage rétrograde « retrograde-flushing ».

##### 1.1.1.2. Plasma sanguin bovin

Les échantillons de sang ont été collectés sur des vaches de différents états corporels appartenant à plusieurs élevages d'Amizour. Ces prélèvements sanguins ont été obtenus à partir de la veine caudale, par le vétérinaire traitant, dans des tubes contenant du citrate de sodium (figure 9).



**Figure n°9** : Sang complet des vaches prélevé dans des tubes contenant du citrate de sodium.

### 1.1.2. Produits chimiques utilisés

- Solution de chlorure de sodium NaCl 0,9%.
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  base
- $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  acide
- $\text{H}_2\text{O}_2$  (30%)
- Eau distillée

### 1.1.3. Matériels de laboratoire utilisés

- Centrifugeuse



**Figure n°10** : centrifugeuse de marque ALC centrifugette 4206

- **Analyseur informatique** : l'analyse des paramètres spermatique a été réalisée par un analyseur informatique de marque SCA (Sperm class analyser).



**Figure n°11** : analyseur informatique de marque SCA

- **Sonicateur :**



**Figure 12 :** Sonicateur VCX 130 (130 watts)

## **1.2. Méthodes**

### **1.2.1. Collecte du sperme épидидymaire**

Le contenu de la région caudal de l'épididyme est récupéré à l'aide de la méthode de rinçage rétrograde « retrograde-flushing ». Effectuée comme suite :

#### **Dissection de l'épididyme :**

- Les tissus qui enveloppent le testicule et l'épididyme ont été enlevés à l'aide d'une lame tranchante (Figure 13).



**Figure n°13 :** Testicule après l'avoir dépourvu de la tunique vaginale.

- L'épididyme et le canal déférent ont été complètement isolés du testicule, rincés et séchés avec du papier absorbant. (Figure 14).

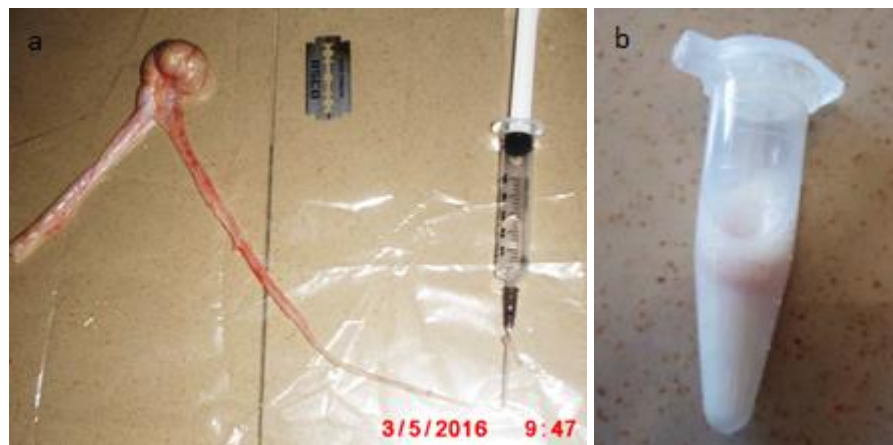


**Figure n°14 :** Epididyme juste après sa dissection du testicule.

- Le canal déférent a été épuré des tissus en excès et la queue de l'épididyme a été isolée avec les vaisseaux sanguins.

**Récolte de la semence :**

- La semence a été récoltée avec la méthode rétrograde (figure 15-a) : l'aiguille d'une seringue remplie de 1 ml d'NaCl et d'air est introduite dans la lumière du canal déférent ;
- Une incision a été réalisée au niveau de la queue de l'épididyme tout en faisant attention à ne pas toucher les vaisseaux sanguins afin d'éviter toute contamination de la semence avec le sang ;
- Un tube gradué (Eppendorf) a été placé juste au-dessous de l'incision réalisée afin de récolter la semence (figure 15-b).

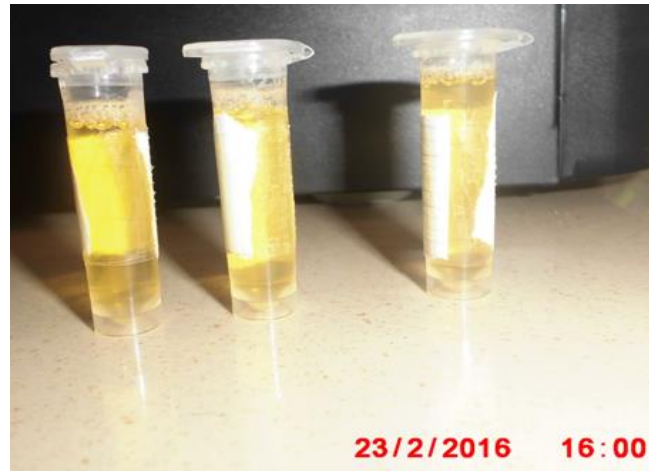


**Figure n° 15 :** récolte de sperme avec la méthode rétrograde.



### 1.2.2. Traitement des échantillons de sang

Les échantillons de sang collectés au niveau des élevages ont été transportés dans une glacière au laboratoire, dans l'heure, et ont été centrifugés à 5000 rpm pendant 15 min et le plasma a été récupéré et conservé à - 4°C jusqu'au jour de leur utilisation.



**Figure n° 16** : Plasma récupérés après centrifugation des échantillons de sang.

### 1.2.3. Dilution du sperme et des échantillons de plasma

#### 1.2.3.1. Dilution du sperme épидидymaire

Le sperme a été pré-dilué pour avoir une concentration d'environ 200 millions spermatozoïdes/ml soit un rapport de dilution de 1 :10 (1 ml de sperme frais dans 9 ml de la solution physiologique).

Le volume obtenu du sperme pré-dilué (10 ml) a été divisé en deux : 8.6 ml pour l'étude du stress oxydatif (pour avoir une concentration finale après co-incubation avec le plasma de 100 millions de spermatozoïdes/ml) et 1.4 ml pour l'étude de la mobilité. Ce volume destiné à l'étude de la mobilité a été encore dilué à 1 :2 avec la solution saline (pour avoir une concentration finale après co-incubation avec le plasma de 50 millions de spermatozoïdes/ml).

#### 1.2.3.2. Dilution de plasma :

Le plasma a été dilué à 2 :5 (pour avoir une concentration finale après co-incubation avec le sperme de 20%).

### 1.2.4. Co-incubation du sperme avec le plasma

#### 1.2.4.1. Pour l'évaluation de la mobilité

Le sperme dilué a été ajouté aux échantillons de plasma dilué avec un taux de 1 :2 (pour une concentration finale de 50 millions de spermatozoïdes /ml). L'ensemble a été

incubé pendant 10 min à température ambiante. La mobilité a été mesurée à T0 (après 10 min de la co-incubation), à T1 (après 1h), à T2 (après 2h), à T3 (après 3h), à T4 (après 4h), à T5 (après 5h) et à T6 (après 6h) à l'aide de l'analyseur informatique de sperme SCA (sperm class analyzer) en suivant le protocole suivant : Un volume de 10 µl de chaque mélange a été placé dans une chambre de Makler, puis observée sous microscope à contraste de phase relié au CASA avec un grossissement 10 : Trois champs différents ont été analysés 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).

#### **I.2.4.2. Pour l'évaluation du stress oxydatif par le test à l'hémoglobine**

Le sperme pré-dilué a été ajouté aux échantillons de plasma dilué à un taux de 1 :2 (pour une concentration finale de 100 millions de spermatozoïdes/ml) et le mélange a été incubé pendant 4 h à température ambiante.

Au bout de ces 4 h de co-incubation, les échantillons ont été soumis à une centrifugation (800 ×g ; 10min) afin d'éliminer le surnageant (le plasma+diluant) et garder le culot (les cellules spermatiques). Ce dernier (le culot) a été dilué dans 1500 µl d'eau distillée et a été soumis à deux cycles de sonication (traitement par ultrasons) de 40 s chacun avec un temps de repos de 40 s. le but de cette étape est de libérer le contenu cellulaire des spermatozoïdes.

Les échantillons ayant subi le traitement par ultrasons ont été centrifugés (6000×g ; 15min) afin d'éliminer le culot (comportant les débris des cellules spermatiques) et garder le surnageant (comportant le contenu des spermatozoïdes). Ce dernier a été conservé à -25°C pour une utilisation ultérieure.

#### **Test à 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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (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 lu (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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) dépourvu de l'hémoglobine.

Afin de vérifier un éventuel effet (anti ou pro oxydant) des surageants sur l'hémoglobine, deux témoins (négatif : contenant de l'hémoglobine diluée uniquement sans initialisateur du stress oxydatif H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ; et positif contenant l'hémoglobine diluée et H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ont été ajoutés.

Résumé des composantes du test :

- Témoin positif oxydé par le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100 µl d'HG + 800µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + 5000 µl d'eau distillée) (Blanc du témoin + : 800µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + 5100 µl d'eau)
- Témoin négatif non oxydé par le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100 µl d'HG + 5800 µl d'eau) (Blanc du témoin négatif : (5900 eau distillée)
- Échantillons : (100 µl surnageant + 100 µl d'HG) + 4900 µl eau distillée + 800 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Blanc de l'échantillon : 100 µl de surnageant + 800µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + 5000 µl d'eau distillée).
- Témoin : 100 µl de surnageant + 100 µl de l'hémoglobine + 4900 µl d'eau distillé + 800 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

### **1.3. 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 BCS et du temps sur le % de spermatozoïdes assignés à ses sous-populations des spermatozoïdes a été exploré par l'analyse de la variance.

## Résultats

### 2.1. Effet du plasma sur la mobilité totale

#### a. Effet du plasma par rapport au témoin

L'effet du plasma sur le pourcentage de spermatozoïdes mobiles a été significatif par rapport au témoin durant toute la durée d'incubation. En effet, le pourcentage des spermatozoïdes mobiles a été plus élevé ( $P < 0.05$ ) en présence du plasma par rapport au témoin sans plasma et ce quel que soit le BCS, excepté à t6 où le plasma provenant de vaches grasses (BCS = 4 à 4.5) a eu un effet similaire à celui du témoin (figure 17).

#### b. Comparaison des effets entre BCS

Le plasma a stimulé la mobilité totale indépendamment du BCS à t0, t3 et t5 (Figure 17). Durant les points temporels restant, le plasma provenant de vaches ayant un BCS de 3 a eu plus d'impact positif sur le pourcentage de spermatozoïdes mobiles ( $P < 0.05$ ) par rapport à tous les autres BCS à t2, par rapport aux vaches maigres (BCS = 1.5 à 2 à t1 et BCS = 1.5 à 2.5 à t4) et par rapport aux vaches grasses (BCS = 4 à 4.5) à t2, t3 et t6.

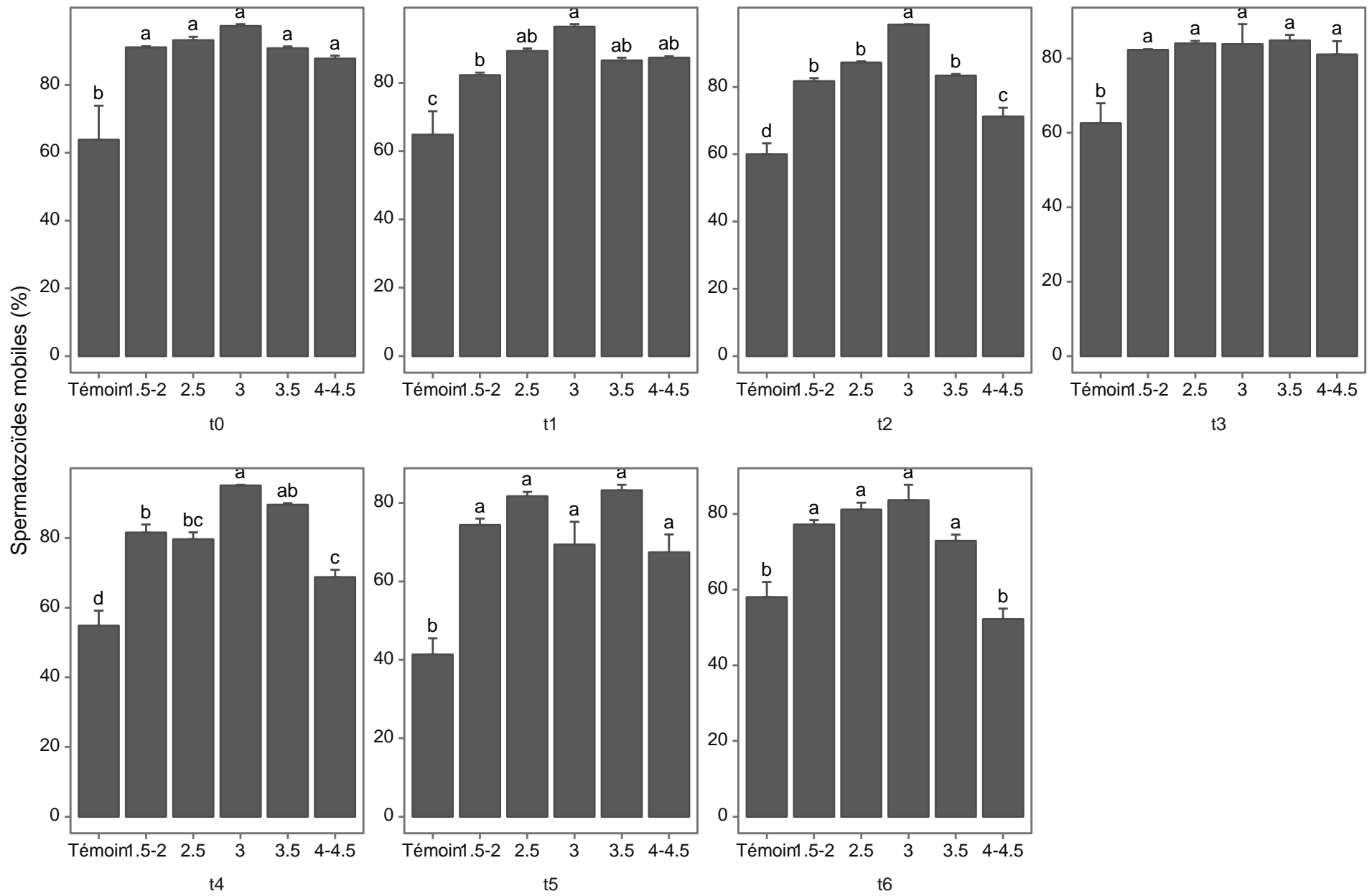
Le plasma provenant de vache ayant un BCS de 3.5 a également influencé la mobilité spermatique plus que celui des vaches grasses (t2, t4 et t6) mais d'une manière moindre par rapport à celui des vaches à BCS = 3.

#### 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 plasma) durant toute la durée d'incubation.

Par contre, le pourcentage de spermatozoïdes mobiles est resté à des niveaux plus élevés (de 60% à plus de 90%) pour les échantillons contenant du plasma durant les 6 heures d'incubations (mis à part pour BCS = 4 à 4.5 pour lesquels ce pourcentage descend jusqu'aux alentours de 50% à t6).

Par ailleurs, la mobilité totale a été plus stable pour les échantillons renfermant du plasma provenant de vaches de BCS moyens (de 3 à 3.5) par rapport aux autres et ceci, est plus valable pour les échantillons incubés avec le plasma de vaches grasses pour lesquels le profil d'évolution est le plus instable (Figure 18).



BCS

Figure : Effet du BCS sur le pourcentage de spermatozoïdes mobiles(motilité totale

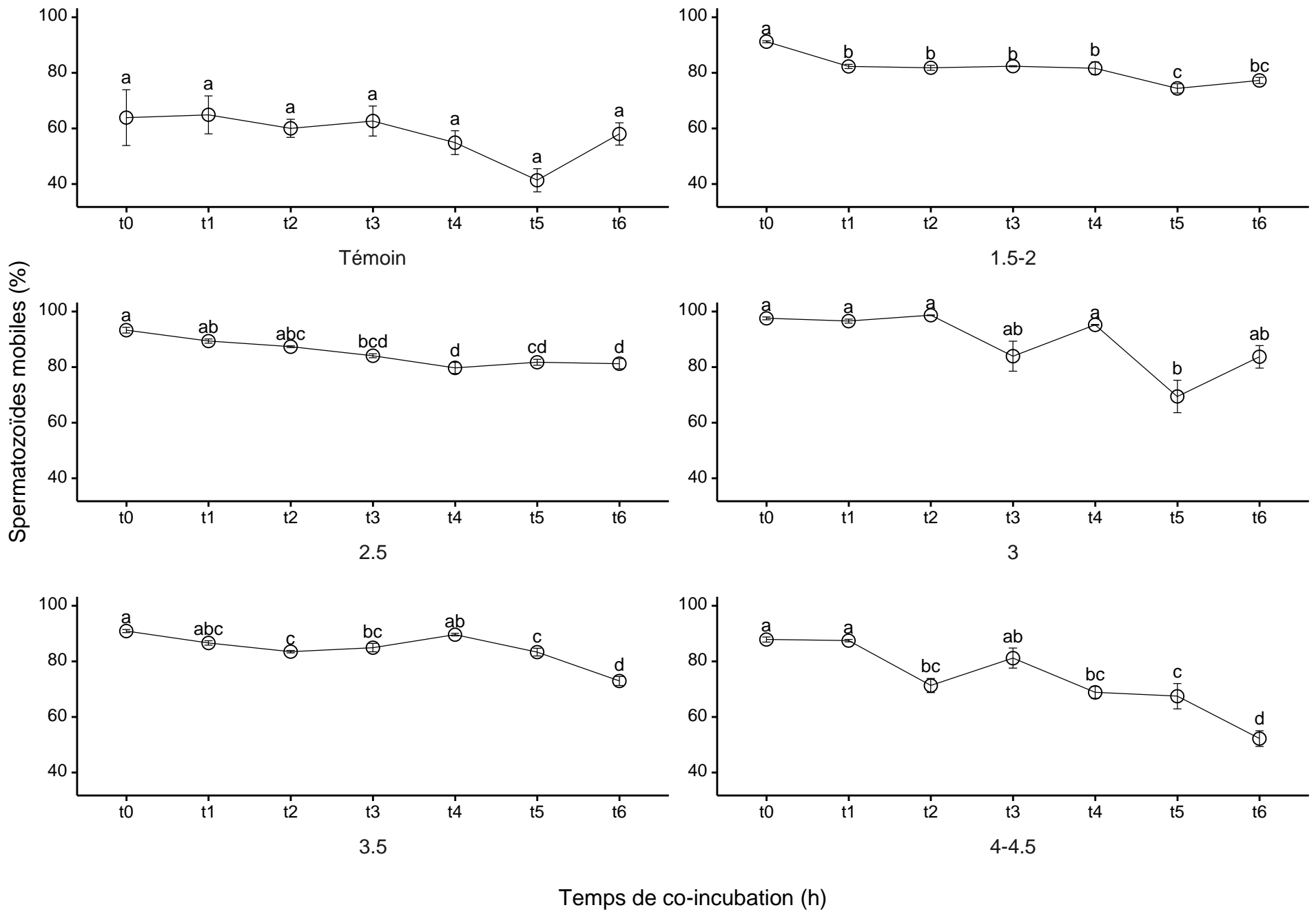


Figure : Évolution du pourcentage de spermatozoïdes mobiles pour chaque BCS en fonction du temps d'incubation

## 2.2. Effet du plasma sur les sous populations des spermatozoïdes

### 2.2.1. Description des classes

**Tableau 4 :** Caractéristiques des sous-populations de spermatozoïdes

Paramètre spermatique	classe1	classe2	classe3
n sptz (%)	25 698 (44.5%)	18913 (33.0%)	13057 (22.5%)
VCL $\mu\text{m/s}$	73,19	67,39	21,46
VSL $\mu\text{m/s}$	49,94	19,44	3,75
VAP $\mu\text{m/s}$	58,14	39,11	10,49
ALH $\mu\text{m}$	2,98	3,94	1,61
BCF hz	5,63	4,37	2,34
LIN %	68,6	30,04	19,19
Str %	85,1	51,94	36,48
WOB %	80,27	58,14	50,21

Le tableau montre que les spermatozoïdes de la sous-population 1 (classe 1) sont les plus rapides (valeurs de VCL, VSL et VAP les plus élevées), les plus vigoureux (valeur de BCF la plus élevée et celle de l'ALH qui est assez élevée) et les plus linéaires (valeurs de LIN, STR et WOB également les plus élevés) par rapport aux deux autres sous-populations (classes 2 et 3). Cette sous-population constitue la plus large des trois en incluant 44.5% de la population totale des spermatozoïdes motiles.

À l'opposé, la 3<sup>e</sup> sous-population (classe 3) représente les spermatozoïdes les plus lents, les moins vigoureux et les moins linéaires vues les valeurs des paramètres qui caractérisent cette classe (Tableau 4). Elle représente également la sous-population la plus restreinte en terme de pourcentage de spermatozoïdes mobiles qu'elle renferme (22.5%).

La classe 2, quant à elle, elle rassemble les spermatozoïdes dont le mouvement latéral de la tête est le plus large (valeur ALH la plus élevée). Pour les autres paramètres, les spermatozoïdes assignés à cette classe possèdent des valeurs intermédiaires par rapport aux deux précédentes (classe 1 et 3). Elle inclus 33% du nombre total de spermatozoïdes mobiles.

Dans la suite de cette étude, l'intérêt a été porté uniquement sur la classe 1 qui englobe les spermatozoïdes qui ont le profil de spermatozoïdes hyper-activés.



## **2.2.2. Effet du BCS sur la sous-population des spermatozoïdes les plus rapides (SP1)**

### **a. Effet du plasma par rapport au témoin**

Comme il a été constaté auparavant pour la mobilité globale, le pourcentage des spermatozoïdes les plus rapides et les plus vigoureux (classe 1) a été plus élevé en présence qu'en absence (témoin) du plasma et ce à partir de t1 jusqu'à t5 et ce quel que soit le BCS des vaches à partir desquelles il a été prélevé.

### **b. Comparaison des effets entre BCS**

Là aussi, comme ça été constaté pour la mobilité totale, le pourcentage de spermatozoïdes assignés à la sous-population 1 a été plus important ( $P < 0.05$ ) dans les échantillons renfermant du plasma provenant de vaches de BCS de 3 par rapport aux échantillons renfermant du plasma provenant de vaches les plus maigres : BCS = 1-1.5 (à t2), de vaches grasses : BCS=4-4.5 (à t2, t3 et t5) et de vaches de BCS = 3.5 (de t1 à t3) (Figure 19).

### **c. Évolution du pourcentage des spermatozoïdes les plus rapides dans le temps**

Le pourcentage des spermatozoïdes les plus rapides et les vigoureux (classe 1) a été stable durant toute la durée d'incubation et ce quel que soit le milieu dans lequel les spermatozoïdes ont été incubés, en présence ou en absence du plasma. Cependant, le pourcentage de spermatozoïdes assignés à cette sous-population (classe 1) a été plus élevé et y est resté à des niveaux plus élevés dans les échantillons qui contiennent du plasma (40 à 60% vs 10 à 40% pour le témoin) (Figure 20).

## **2.1.4. Statut oxydatif**

### **a. Effet du plasma par rapport au témoin**

À l'exception de t0, Il apparaît clairement, à partir de la (figure 21), que l'hémoglobine a été mieux protégée dans les échantillons ayant été incubés auparavant avec le plasma durant toute la durée de suivi par rapport au témoin (non incubé préalablement avec le plasma).

Comparativement au témoin + (comportant l'HG, dépourvu du contenu spermatique et exposé à l'action de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), l'absorbance de l'HG incubée avec ces échantillons préalablement traités par le plasma a été, durant toute la durée de suivi, inférieure à celle de ce témoin-.

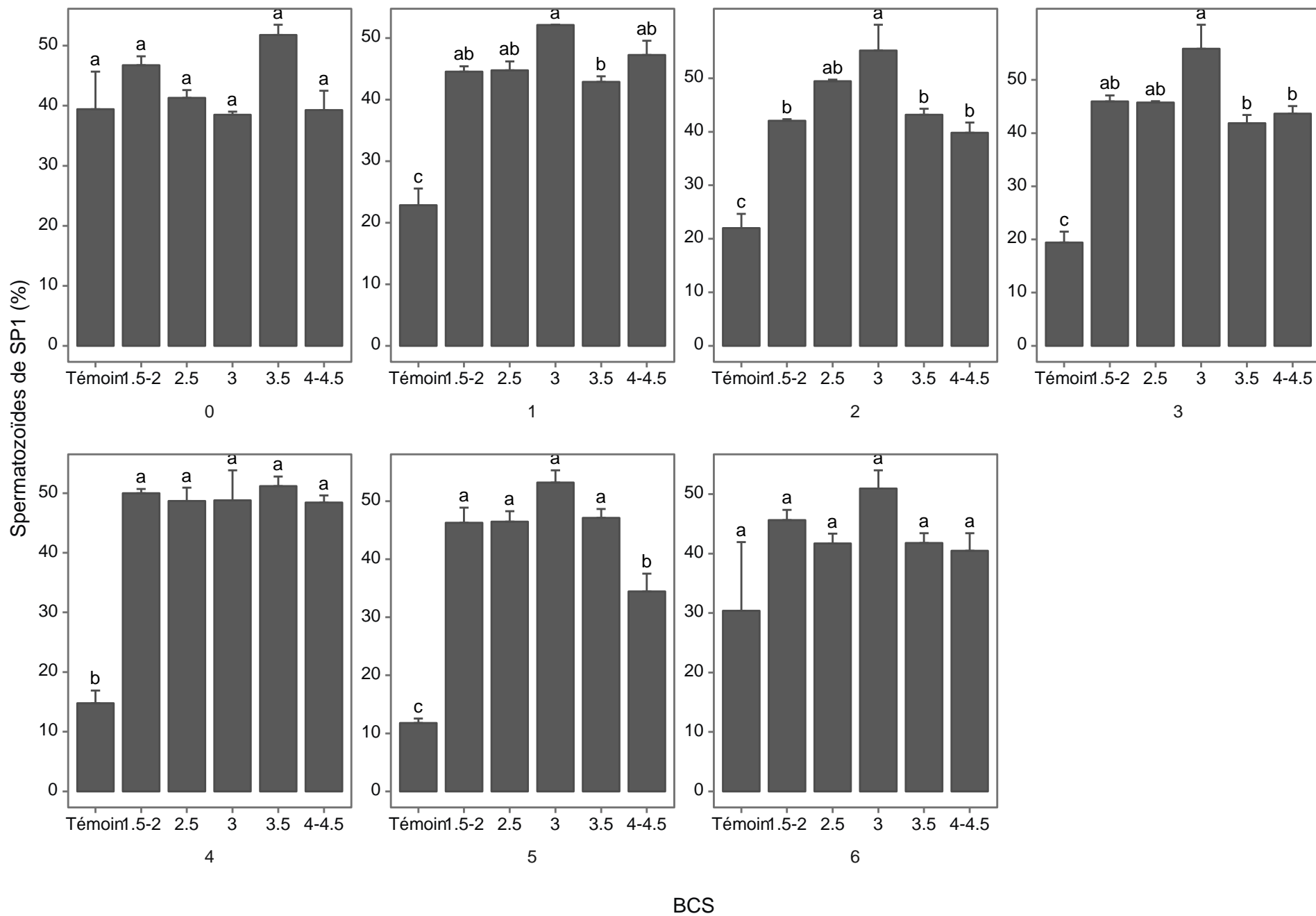
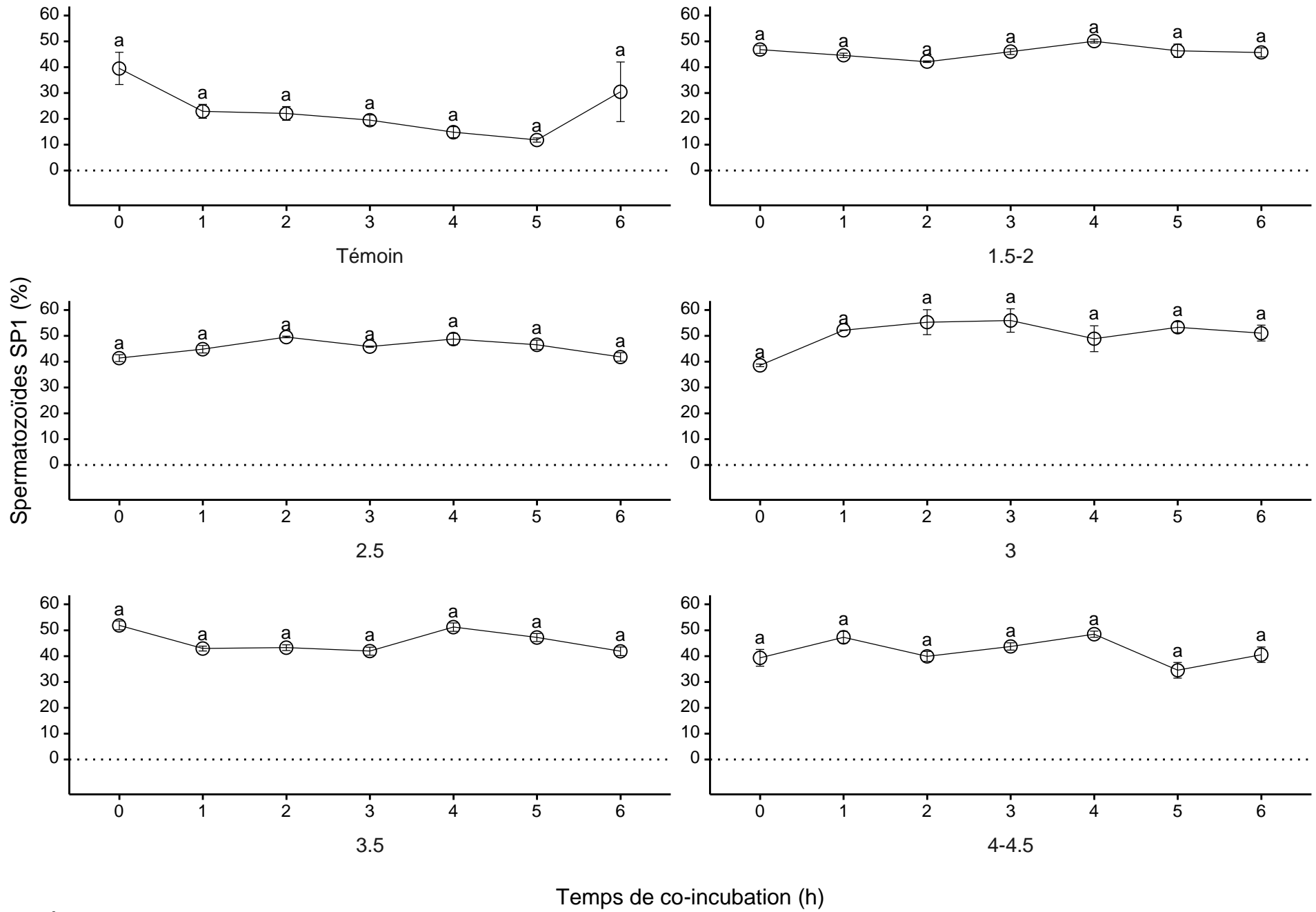


Figure : Effet du BCS sur le pourcentage de spermatozoïdes assignés à la sous-population 1 (SP1)



Temps de co-incubation (h)

Figure : Évolution du pourcentage de spermatozoïdes assignés à SP1 pour chaque BCS en fonction du temps d'incubation

### **b. Comparaison des effets entre BCS**

Les échantillons ayant été incubés avec le plasma provenant de vaches ayant un BCS compris entre 2.5 et 3.5 semblent avoir plus d'impact positif sur la protection des spermatozoïdes contre le stress oxydatif à partir de t16 par rapport aux autres BCS. Avant ce temps, les absorbances de l'HG ont été similaires entre les différents BCS.

### **c. Évolution en fonction de temps**

Alors que l'absorbance de l'hémoglobine au niveau du témoin (non préalablement incubé en présence du plasma) a connu une variation entre 0.38 à 0,72 en connaissant une série de baisses importantes à chaque heure à t1, t2 et à t3, l'absorbance de l'hémoglobine dans les échantillons préalablement incubés avec le plasma, indépendamment du BCS, a été maintenue à des niveaux élevés, dépassant 0.60, jusqu'à t6, avant de s'effondrer à t21 d'une manière dépendante du BCS, pour atteindre ~0.49 pour les BCS 1.5-2 et 4-4.5 et plus de 0.55 pour les BCS 2.5, 3 et 3.5.

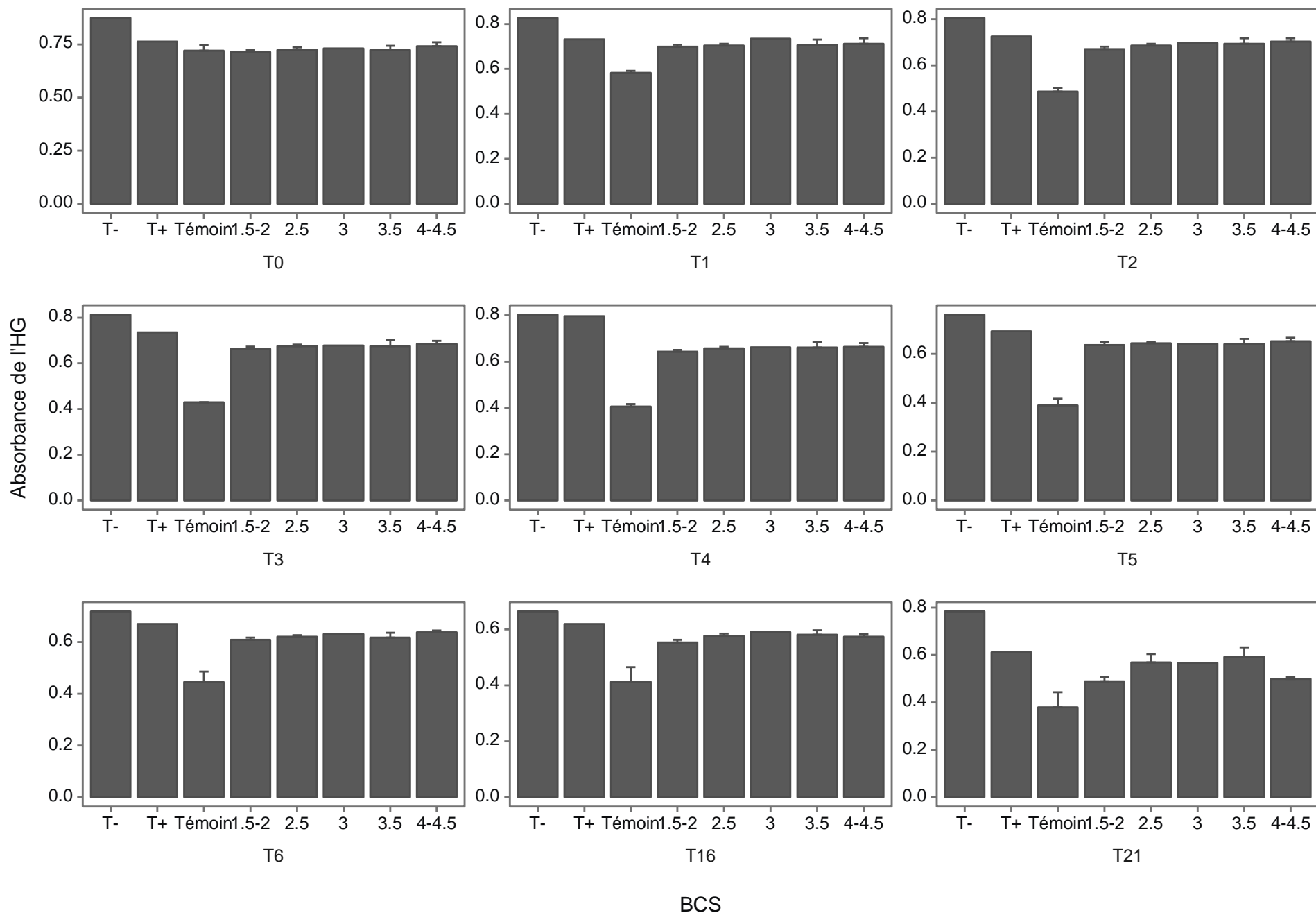


Figure : Effet du BCS sur la protection de l'hémoglobine de la dégradation (absorbance)

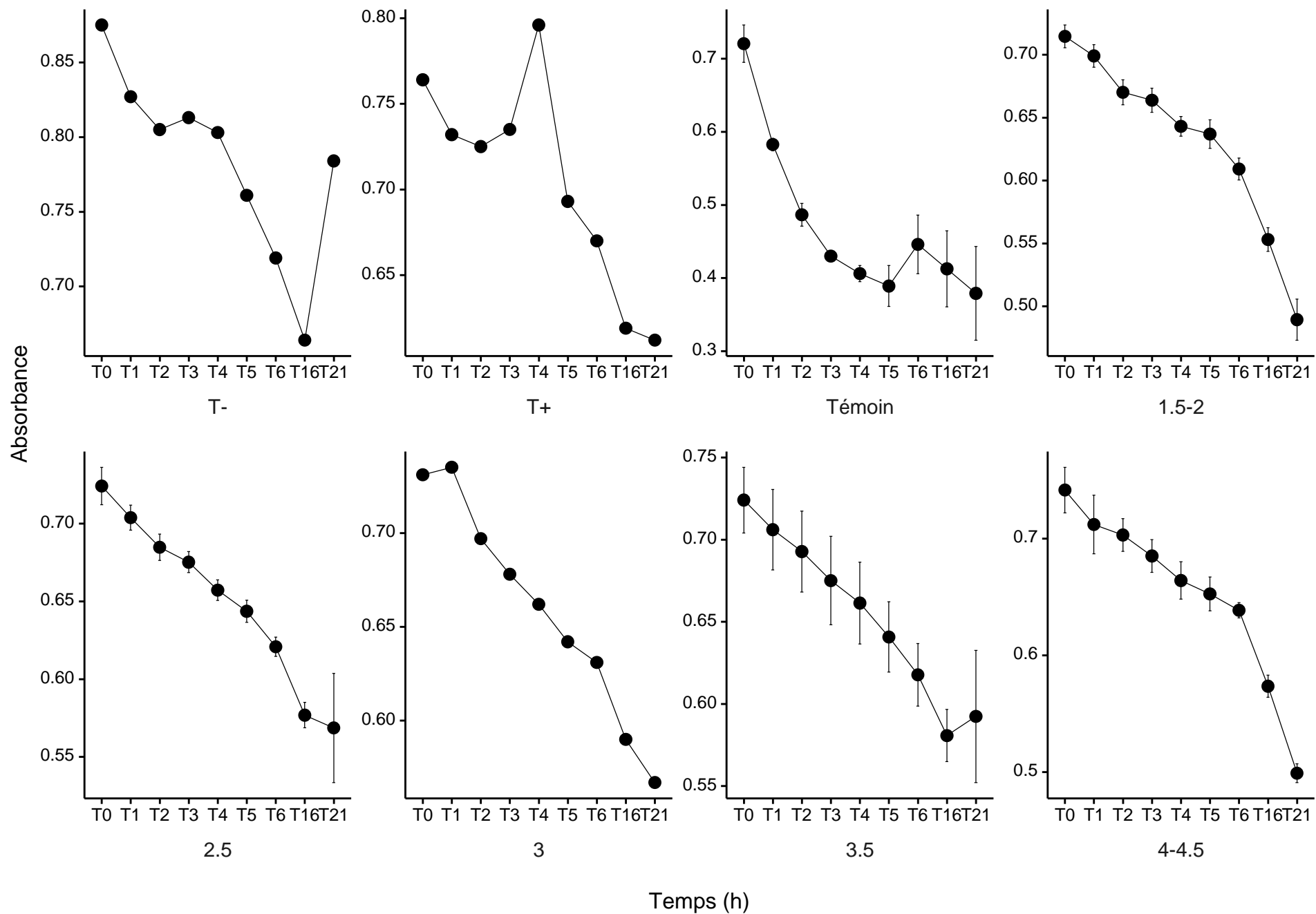


Figure: Évolution de l'absorbance de l'HG pour chaque BCS en fonction du temps

## Discussion

L'incubation des spermatozoïdes en présence du plasma a eu un effet positif sur la mobilité spermatique. En effet, il a été rapporté que le plasma de sang frais a un effet bénéfique sur la mobilité des spermatozoïdes (Binor *et al.*, 1981). Chez l'humain, l'effet stimulant de plasma de la femelle sur la motilité des spermatozoïdes a été signalé par de nombreux auteurs (Liu *et al.*, 1986 ; De Lamirande *et al.*, 1991 ; Akerlof *et al.*, 1989). Cet effet positif a été également démontré chez le chien (Iguer-ouada et Verstegen, 2001). En outre, certains auteurs ont recommandé la supplémentation de plasma pour améliorer les taux de fertilité dans la procréation médicalement assistée (AMP) (Liu *et al.*, 1986).

L'effet positif et persistant du plasma a été notamment mis en évidence comparativement au témoin qui contient la solution physiologique seule. Un résultat similaire a été rapporté par Panidis *et al.* (Panidis *et al.* 1982) qui ont exploré l'effet du plasma humain sur la mobilité spermatique par comparaison à la solution saline.

Cet effet stimulateur du plasma ou du sérum sur la mobilité a été associé à plusieurs composants contenus dans ces liquides notamment l'albumine et surtout des glycoprotéines appelées (FMSP : forward motility stimulating proteins) qui ont été isolées du sérum de buffle (Mandal *et al.* 2006).

Par ailleurs, le plasma a eu un impact positif sur le pourcentage de spermatozoïdes les plus actifs (classe 1). Les spermatozoïdes regroupés dans cette sous-population représenteraient ceux qui sont probablement les plus susceptibles de féconder un ovule. L'hyperactivation, la capacitation et la réaction acrosomiques des spermatozoïdes par le plasma /sérum a été largement rapporté dans la bibliographie et chez plusieurs espèces (Barros *et al.* 1972; Mbizvo *et al.* 1990; Csiba *et al.* 2015).

D'un autre côté, le plasma provenant de vaches ayant un BCS de 3 a eu plus d'impact positif sur le pourcentage de spermatozoïdes mobiles total et les plus actifs (classe 1); de même, le plasma provenant de vache ayant un BCS de 3.5 a également influencé la mobilité spermatique plus que celui des vaches grasses. 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).

Enfin, Il apparait clairement que l'hémoglobine a été mieux protégée dans les échantillons ayant été incubés auparavant avec le plasma durant toute la durée de suivi par rapport au témoin qui ne l'a pas été. Ceci suggèrerait que le plasma possèderait des systèmes de défenses antioxydants dont le spermatozoïde est dépourvu. En effet, Il a été démontré que l'albumine de sérum bovin BSA protège le sperme de lapin et les hommes contre les radicaux libres (Alvarez & Storey, 1983) et stimule leur motilité (Ashrafi et *al.*,2013). Par ailleurs, Chen et *al.* (Chen et *al.* 1993) ont rapporté que la présence du sérum réduit la peroxydation lipidique des spermatozoïdes et cette réduction de la peroxydation lipidique a été associée à une réduction de la perte de leur mobilité.



## Conclusion et perspective

Le principal objectif de ce travail a été d'étudier l'influence de plasma prélevé de vaches de différents états corporels sur la mobilité et le statut oxydatif des spermatozoïdes.

Notre approche expérimentale a, d'abord, consisté à montrer l'effet de plasma sur la mobilité totale et sur celle de la sous-population des spermatozoïdes les plus actifs. Nous avons utilisé comme témoin le milieu de dilution du sperme (la solution physiologique de NaCl à 0.9%) et le plasma traité pour examiner un éventuel effet des BCS sur la mobilité des spermatozoïdes. D'autre part, on a essayé de montrer l'effet de stress oxydatif sur les spermatozoïdes et de le relier à la mobilité.

Après les tests effectués, il s'est avéré qu'en général, le plasma, a amélioré la mobilité totale et a stimulé le pourcentage de spermatozoïdes les plus rapides, les plus vigoureux et les plus linéaires (classe 1) qui représentent la sous-population de spermatozoïdes mobiles les plus susceptibles, parmi les trois sous-populations, de féconder un ovule. En outre, le plasma issu de vaches à BCS moyen s'est distingué en montrant non seulement un effet significatif plus que les autres traitements et témoin mais en plus cette influence persistée dans le temps.

Par ailleurs, le test à l'hémoglobine a révélé que l'hémoglobine, et par déduction, les spermatozoïdes sont mieux protégés contre le stress oxydatif en présence du plasma par rapport au témoin sans plasma et ce quel que soit le BCS. D'autre part, le plasma provenant de vaches ayant des BCS de 2.5 à 3.5 semblent avoir plus d'impact positif sur la protection des spermatozoïdes contre le stress oxydatif à partir de t16 par rapport au témoin sans plasma et aux autres BCS. Il est important de souligner la convergence des deux types de résultats : ceux de la mobilité totale et spécifique des spermatozoïdes les plus actifs d'un côté et ceux du test à l'hémoglobine et ceci suggérerait que l'amélioration constatée de la mobilité peut être expliquée en partie par l'amélioration du statut oxydatif.

Enfin, ces résultats obtenus permettent de souligner l'effet bénéfique qu'apporte le plasma de vache à BCS moyen sur la mobilité et le statut oxydatif des spermatozoïdes qui pourrait être utilisé comme supplémentation pour augmenter la mobilité des spermatozoïdes et, par conséquent, améliorer la fertilité.

## Références bibliographiques

- Agabriel J, Giraud Jm, Petit M, Barboiron C CGE Al. 1986. Détermination et utilisation de la note d'état d'engraissement en élevage allaitant. *BullTechCRZV*,66.:43–50.
- Agarwal A, Saleh RA, Bedaiwy MA. 2003. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertil Steril*. 79:829–43.
- Ahmed R, Tripathi AK, Tripathi P, Singh S, Singh R, Singh RK. 2008. Malondialdehyde and protein carbonyl as biomarkers for oxidative stress and disease progression in patients with chronic myeloid leukemia. *in vivo*. 22:5256528.
- Akerlof E, Fredricsson B, Gustafson O, Lunell NO, Nylund L, Rosenborg L, Slotte H, Pousette A. 1989. Serum factors stimulate the motility of human spermatozoa. *Int J Androl*. 12:124–130.
- Ben Ali H, Atig F, Mehri S, Saad A, Ajina M. 2012. Analyse du statut oxydatif spermatique chez des patients infertiles. *Andrologie*. 22:233–240.
- Alvarez JG, Storey BT. 1983. Taurine, hypotaurine, epinephrine and albumin inhibit lipid peroxidation in rabbit spermatozoa and protect against loss of motility. *Biol Reprod*. 29:548–555.
- Angelos M, Kotalav K, Torres CA, He G, Stoner J, Mohammed M, Kuppusamy P. 2005. Hypoxic reperfusion of the ischemic heart and oxygen radical generation. *Am J Physiol Hear Circ Physiol*. 290:341–347.
- Antolovich M, Prenzler PD, Patsalides E, McDonald S, Robards K. 2002. Methods for testing antioxidant activity. *Analyst*. 127:183–198.
- Antwerpen P. 2006. Contribution à l'étude du pouvoir antioxydant de divers agents d'intérêt thérapeutique: ciblage du système myclopéroxydase / peroxyole d'hydrogène/ chlorure. [place unknown]: Thèse Présentée En Vue De L'obtention Du Grade De Docteur En Science Pharmaceutiques Bruxelles.
- Ashrafi I, Kohram H, Tayefi-Nasrabadi H. 2013. Antioxydant effets of bovine serum albumin on kinetics, microscopic and oxydative characters of cryopreserved bull spermatozoa. *Spanish J Agric Res*. 11:695–701.
- Atamer A, Bilici A, Yenice N, Selek S, Ilhan N, Atamer Y. 2008. The importance of paraoxonase activity, nitric oxide and lipid peroxidation in hepatosteatosis. *J Med Res*. 36:771–776.
- Badinand F, Bedouet J, Cosson JL, Hanzen C, Vallet A. 2000. Lexique des termes des physiologie et pathologie et performances de reproduction chez les bovins. *Ann Vétérinaire*. 144:289–301.
- Barone R. 1978. Anatomie comparée des mammifère domestiques. Frères V-TL, editor. [place unknown].
- Barone R. 2001. Anatomie comparée des mammifères domestique. 4th ed. Vigot P, editor. [place unknown].
- Barret JP. 1992a. Zootechnie générale agriculture d'aujourd'hui sciences, technique, applications. Ed LavoisierParis. 252:108–116.
- Barret JP. 1992b. Agriculture d'aujourd'hui, sciences, techniques, applications. *Zootech Générale - Paris*.:180.

- Barros C, Arrau J, Herrera E. 1972. Induction of the acrosome reaction of golden hamster spermatozoa with blood serum collected at different stages of the oestrous cycle. *J Reprod Fertil.* 28:67–76.
- Bazin S. 1984. Grille de notation de l'état d'engraissement des vaches pie-noires. Paris (France).:31.
- Beckmen K, Ames B. 1998. The free radical theory of aging matures. *Physiological Rev.* 78:574–581.
- Bellik Y, Iguer-Ouada M. 2015. A useful method based on cell-free hemoglobin analysis for evaluating antioxidant activity. *Royal Soc Chem.*
- Binor Z, Sokoloski J, Wolf D. 1980. Penetration of the zona-free hamster egg by human sperm. *Fertil Steril [Internet].* 33:321–327. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9414630>
- Bonnes G, Desclauze J. 2005. Reproduction des animaux d'élevage. 2nd ed. Educagri, editor. [place unknown].
- Bouchard E. 2003. Portrait québécois de la reproduction. In: *Symp Sur Les Bov Lait.* [place unknown]; p. 12.
- Boyer S, Davis R, Katz D. 1989. Automated semen analysis cur-r probl obstet gynecology. In: *Comput Assist semen Anal Androl research vetrinary Pract.* [place unknown]; p. 167–200.
- Brisson J. 2003. Nutrition, alimentation et reproduction. [place unknown]: Centre De Référence En Agriculture Et Agroalimentaire Du Québec.
- Broster W, Broster V. 1998. Body score of dairy cows. *JDairy Res,* 65.:155–173.
- Cadenas E, Davies J. 2000. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress and aging. *Free Radic Biol Med.* 29:222–230.
- Cary JA, Madills K, Farnsworth JT, Hayna E, Duos L, Fahning ML. 2004. A comparison of electroejaculation and epidymal sperm collection techniques in stallions. *Can Veterinary J.*:35.
- Charles T, Levasseur MC. 2001. La à reproduction chez les mammifères et l'homme. Coédition INRA-Ellipses.:756–289.
- Chen K, Suh J, Carr AC, Morrow JD, Zeind J, Frei B. 2000. Vitamin c suppresses oxidative lipid damage in vivo, even in the presence of iron overload. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 279:1406–1412.
- Chenoweth PJ. 1997. Clinical reproductive anatomy and physiology of the bull. In: Elsevier S, editor. *Curent Ther Large Anim Theriogenology.* 2nd ed. [place unknown]; p. 217.
- Cimen MYB. 2008. Free radical metabolism in human erythrocytes. *Clin Chim Acta.* 390:1–11.
- Contri A, Valorz C, Faustini M, Wegher L, Carluccio A. 2010. Effect of semen preparation on casa motility results in cryopreserved bull spermatozoa. *Theriogenology.*:424–435.
- Csiba A, Gyökér E, Gergátz E, Gombkötő N. 2015. Effect of semen plasma and blood serum for motility (%) and capacitation status of cryopreserved and thawed ram semen. *Exp [Internet].* 34:2150–2161. Available from: [http://www.experimentjournal.com/expadmin/pdf/\\_files/Csiba](http://www.experimentjournal.com/expadmin/pdf/_files/Csiba),
- Dacheux F, Dacheux JL. 2001. La à reproduction chez les mammifères et l'homme. In: INRA-Ellipses C, editor. *La Reprod chez les mammifères l'homme.* [place unknown]; p. 290–315.

- Dalle-Donne I, Rossi R, Colombo R, Giustarini D, Milzani A. 2006. Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clin Chem.* 52:601–623.
- Davis R, Rothmann S, Overstreet J. 1992. Accuracy and precision of computer-aided sperm analysis in multicenter studies. In: *Eff Semen Prep CASA Motil Results Cryopreserv Bull Spermatozoa*. [place unknown]; p. 648–653.
- Derivaux J. 1971. Reproduction chez les animaux domestiques tome ii, le mâle: insémination artificielle. Derouaux, editor. [place unknown].
- Deutshier GH, Wells ME, Battaglia RA. 1974. Evaluation of epididymal sperm by the cannulation technique and the effects of in vivo storage in angus bulls. *J Anim Sci.*:1136–1143.
- Djabakou K, Fimmen HO, Bottger M. 1984. Examination of bull semen at creat-trypanotolerance and animal production. *Avetonou(Togo)*.:40–44.
- Drame ED, Hanzen C, Houtain JY, Laurent Y, Fall A. 1999. Profil de l'état corporel au cours du post-partum chez la vache laitière. *Ann Med Vet.* 143:265–270.
- Durand D, Damon M, Gobert M. 2013. Le stress oxydant chez les animaux de rente: principes généraux. *Cah Nutr Diet*.
- Ezekwe AG. 1988. Ejaculate characteristics of two breeds of tropical bulls-n'dama and muturu-joint seminar on animal reproduction for african countries. In: *Addis-Abeba:CIPEA*, editor. [place unknown].
- Faverdin P, Delaby L, Delagarde R. 2007. L'ingestion d'aliments par les vaches laitières et sa prévision au cours de la lactation. *INRA Prod Anim.* 20:151–162.
- Frank M, Faraci, Sean P, Didion. 2004. Vascular protection superoxyde dismutase isoforms in the vessel wall. *Thromb Vasc Biol.* 24:1367.
- Garait B. 2006. Le stress oxydant induit par voie métabolique (régimes alimentaires) ou par voie gazeuse (hyperoxie) et effet de la glisodin. [place unknown]: Thèse De Doctorat En Biologie Cellulaire.Université Joseph Fourier.France.
- Gilbert DL. 2000. Fifty years of radical ideas. *Ann NY Acad Sci.* 899:1–14.
- Giulivi C, Daviess KJA. 1990. A novel antioxidant role for hemoglobin. the comproportionation of ferrylhemoglobin with oxyhemoglobin. *J Biol Chem.* 265:19453–194560.
- Grummer RR. 2007. Strategies to improve fertility of yielding dairy farms : management of the dry period. *Theriogenology.* 68:281.
- Haleng J, Pincemail J, Defraigne J, Charlier C, Chapelle JP. 2007. Le stress oxydant. *Rev Med Liege* [Internet].:11. Available from: <http://www.lbmroanne.com/docs/stress oxydant/Favier.pdf>
- Hanzen C. 2004. Reproduction des ruminants : maitrise des cycles et pathologie. [place unknown]: Université De Liège, Faculté De Médecine Vétérinaire.
- Hanzen C. 2008. La propédeutique de l'appareil reproducteur et l'examen du sperme des ruminants. [place unknown].
- Haskouri H. 2001. Insémination artificielle et détection des chaleurs. In: *Gest La Reprod Chez La Vache*. [place unknown].

- Higashi Y, Noma K, Yoshizumi M, Kihara Y. 2009. Endothelial function and oxidative stress in cardiovascular diseases. *Circ J.* 73:411–418.
- Iguer-Ouada M, Verstegen JP. 2001. Oestrous cycle stage dependent effects of plasma and vaginal fluid on dog semen motility parameters. *Biol Reprod.*
- Jarrige R. 1988. Inra“alimentation des bovins ,ovins,caprins.” INRA P, editor. [place unknown].
- Jones R, Mann T, Sherins R. 1979. Peroxydative breakdown of phospholipids in human spermatozoa, spermicidal properties of fatty acid peroxides, and protective action of seminal plasma. *Fertil Steril.* 31:531–7.
- Kaabi M, Paz P, Alvarez M, Anel E, Boixo JC, Rouissi H, Anel L. 2003. Effect of epididymis handling conditions on the quality of ram spermatozoa recovered post-mortem. *Theriogenologie.*:1249–1259.
- Kabera F. 2008. Appréciation de la qualité de la semence bovine produite au centre national d ’ amélioration génétique (cnag) de dahra au sénégal. [place unknown]: universite cheikh anta diop de dakar.
- De Lamirande E, Gagnon C. 1991. Quantitative assessmant of the serum-induced stimulation of human sperm motility. *Int J Androl.* 14:11–22.
- Van Landschoot A. 2010. Incidence de certains modes d ’ alimentation sur l ’ autonomie alimentaire des exploitations laitières wallonnes. [place unknown]: Institut Supérieur Industriel Huy- Gembloux.
- Lindau-Sehpar B, Shaffer J. 1993. Expression of human catalase in acatalasemic murine svb2 cells confers protection from oxiadative damage. *Free Rad Biol Med.* 15:5818.
- Liu D, Clarke GN, Baker H. 1986. The effect of serum on motility of human spermatozoa in culture. *Int J Androl.* 9:1096117.
- Mandal M, Saha S, Ghosh AK, Majumder GC. 2006. Identification and characterization of a sperm motility promoting glycoprotein from buffalo blood serum. *J Cell Physiol.* 209:353–362.
- Martinez-Pastor F, Garcia Macias V, Alvarez M, Chamorro C, Herraez P, Paz PD, Anel L. 2006. Comparison of two methods for obtaining spermatozoa from the cauda epididymis of iberian reddeer. *Theriogenologie.*:471–485.
- Mayer C, Denis JP. 1999. Élevage de la vache laitière en zone tropicale. CIRAD-envt, editor. [place unknown].
- Mbizvo MT, Thomas S, Fulgham DL, Alexander NJ. 1990. Serum hormone levels affect sperm function. *Fertil Steril* [Internet]. 54:113–120. Available from: <http://europepmc.org/abstract/MED/2358078/reload=0>
- Methorst C, Huyghe E. 2014. Stress oxydant et infertilité masculine : physiopathologie et intérêt thérapeutique des antioxydants. *Progrès En Urol.*:7.
- Migdal C, Serres M. 2011. Reactive oxygen species and oxydative stress. *Med Sci.* 27:405–412.
- Monget P. 2004. Metabolism and bovine reproduction. [place unknown]: Médecin Vétérinaire Du Québec.Proceeding Du Congrès De Buiatrie Québec.
- Moulay Y. 2012. Investigation phytochimique de l ’acacia arabica aux propriétés antioxydantes et inhibitrices. [place unknown]: Université Kasdi Merbah Ouargla.

- Panidis DK, Tarlatzis BC, Tsouras JS, Papaloucas AC. 1982. Objective evaluation of spermatozoa motility as influenced by fresh blood serum and normal saline. *Eur Obs.* 14:23–30.
- Pincemail J, Lecomte J, Collart E, Castiaux JP, Defraigne J. 2010. Stress oxydant, antioxydants et exercice physique. *Vaiss Cœur, Poumons.* 6:1–3.
- Pincemail J, Meurisse M, Limet R, Defraigne JO. 1999. L'évaluation du stress oxydatif d'un individu: une réalité pour le médecin. *Vaiss Cœur, Poumons.* 4:7.
- Rizvi SI, Pandey KB. 2010. Activation of the erythrocyte plasma membrane redox system by resveratrol: a possible mechanism for antioxidant properties. *Pharmacological Reports.* 62:726–732.
- Robert F, Pascard J, Aubert T. 2006. Utilisation d'un marqueur du stress oxydatif pour évaluer l'impact des périodes de stress chez les bovins : cas du vêlage et du transport allotement chez les veaux. *Renc Rech Ruminants.* 13:442.
- Roche J, Friggens N, Kay J, Fisher M, Stafford K, Berry D. 2009. Invited review: body condition score and its association with dairy cow productivity, health, and welfare. *J Dairy Sci.* 92:5769–5801.
- Rodrigues RO, Trevisanuto C, Cooke RF, Vasconcelos JL. 2011. Effects of body weight loss on serum progesterone concentrations of non-lactating dairy cows. *Theriogenology* [Internet]. 75:131–137. Available from: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=20875677](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20875677)
- Ruegg PL. 1991. Body condition scoring in dairy cows: relationships with production, reproduction, nutrition and health. *America TCN*, editor. [place unknown].
- Salisbury GW, Vandermark NL. 1961. *Physiology of reproduction and artificial insemination of cattle.* [place unknown]: San Francisco: Freeman & Co.
- Sanocka D, Kurpisz M. 2004. Reactive oxygen species and sperm cells. *Reprod Biol Endocrinol.* 2:12.
- Satoh K. 1978. Utilisation d'un marqueur du stress oxydatif pour évaluer l'impact des périodes de stress chez les bovins : cas du vêlage et du transport allotement chez les veaux. *Clin Chim Acta.* 90:37–43.
- Sen CK. 2001. Antioxidant and redox regulation of cellular signaling: introduction. *Med Sci Sport Exer.* 33:368–370.
- Sérieys F. 1997. Tarissement des vaches laitières (une période-clé pour la santé, la production et la rentabilité du troupeau). *Agricole F*, editor. [place unknown].
- Setchell BP. 1991. Male reproductive organs and semen. In: *Press SDA*, editor. *CUPPS, P-T Reproduction Domestic Anim.* 4th ed. [place unknown]; p. 221–249.
- Shacter E. 2000. Quantification and significance of protein oxidation in biological samples. *Drug Metab Rev.* 32:307–326.
- Stout MA. 2012. Comparison of epididymal and ejaculated sperm collected from the same holstein bulls. [place unknown]: Doctoral Dissertation, Louisiana State University.
- Tavilani H, Doosti M, Saeidi H. 2005. Malondialdehyde levels in sperm and seminal of asthenozoospermic and its relationship with semen parameters. *Clin Chim Acta.* 365:199–203.

- Turri F, Madeddu M, Gliozzi TM, Gandini G, Pizzi F. 2012. Influence of recovery methods and extenders on bull epididymal spermatozoa quality. *Reprod Domest Anim.*:712–717.
- Valko M, Rhodes C, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact.* 160:1–40.
- Verstegen JP, Iguer-Ouada M. 2002. Evaluation of the “hamilton thorn computer-based automated system” for dog semen analysis. *Theriogenology.*:733–749.
- Vertuani S, Angusti A, Manfredini S. 2004. The antioxidants and pro-antioxidants network: an overview. *Curr Pharm.* 10:167761694.
- Welch WJ. 1992. Mammalian stress response: cell physiology, structure/function of stress proteins, and implications for medicine and disease. *Physiol Rev.* 72:1063–1081.
- Wheeler B. 1996. Guide d'alimentation des vaches laitières.fiche technique. [place unknown]: Ontario,Canada.
- Wolter R. 1992. Alimentation de la vache laitière. In: Etude Des Facteurs Risque L'infertilité Dans Les Elev Bov Lait L'île La Reun Influ L'alimentation Sur La Reprod. [place unknown]; p. 223.
- Wolter R. 1994. Alimentation de la vache laitière. *Fr Agric Paris.*:209.
- Wolter R. 1997. Alimentation de la vache laitière. 3rd ed. Agricole F, editor. [place unknown].
- Wood ZA, Poole LB, Karplus PA. 2003. Peroxiredoxin evolution and the regulation of hydrogen peroxide signaling. *Science (80- )*. 300:650–653.
- Yennek N. 2010. Effet des facteurs d'élevage sur la production et la qualité de lait de vache en région montagnaise. [place unknown]: Thèse Magister En Agronomie, Tizi-Ouzou.
- Yeung C, Weinbauer GF, Cooper TG. 1997. Responses of monkey epididymal sperm of different maturation alstatus to second messengers mediating protein tyrosine phosphorylation, acrosome reaction, and motility. *Mol Reprod Dev.*:194–202.
- Zhu H, Zhang L, Amin AR, Li Y. 2008. Coordinated upregulation of a series of endogenous antioxidants and phase 2 enzymes as a novel strategy for protecting renal tubular cells from oxidative and electrophilic stress. *Exp Biol Med ( Maywood)*. 233:753–765.