

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE ABDERRAHMANE MIRA DE BEJAIA
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE
DEPARTEMENT DES SCIENCES BIOLOGIQUES DE L'ENVIRONNEMENT



جامعة بجاية
Tasdawit n'Bgayet
Université de Béjaïa

MEMOIRE DE FIN DE CYCLE

En vue de l'obtention du diplôme de Master en Reproduction et
Biotechnologie Animale

Thème

*Effet du plasma sanguin de vaches de
différents états physiologiques sur la mobilité
des spermatozoïdes bovins*

Réalisé par :

Mlle : OUENNOUGHI Fatma

Mlle : YAICHE Lynda

Devant le jury :

Président : Mr BOUGAHAM A

Promoteur : Mr NAIT MOULOUD M

Co-promoteur : Mr IGUER-OUADA M

Examineurs : Mme MOUHOU B C

Et : Mme NATOURI N

Année universitaire : 2013/2014



Remerciements

Au terme de notre modeste travail nous remercions dieu le tout puissant de nous avoir donné le courage et la patience de réaliser ce travail.

Nous tenons à adresser nos remerciement a Mr Nait Mouloud qui nous a fait l'honneur de diriger notre mémoire sur un sujet passionnant et nous a aider et guidé tout au long de son élaboration.

Au professeur Mr IGUER-OUADA M. pour nous avoir accueilli dans son laboratoire, ainsi que pour ses précieux conseils et orientation. Qu'il veuille bien agréer notre profonde gratitude.

Nos sincères considération et remerciement sont également exprimés aux membres du jury qui nous on fait l'honneur de leur présence et d'avoir consacré de leur temps pour l'évaluation de ce travail.

Comme nous sommes ravis de saisir l'occasion de remercier tous les enseignants qui ont guidé nos pas vers un avenir brillent

Enfin nos remerciements s'adressent a toutes personnes qui ont contribué de près ou de loin a la réalisation de ce travail ou qui nous ont encouragé et soutenu à tout moment

Fatma et Lynda





Dédicace

J'ai le plaisir de dédier ce modeste travail :

*À celle qui s'est sacrifiée pour que je grandisse, qui a supporté mes fatigues,
me gratifiant de son affection et de son expérience patiente et irremplaçable :*

ma très chère mère.

*À celui qui a tant veillé sur mon bien, qui, patiemment forgea ma
personnalité: à mon cher père.*

*Je ne serai jamais à la hauteur de les remercier comme il se doit, Que notre Dieu
leur rende leur bienfait par une félicité éternelle*

*À mon chère mari YACINE qui ma soutenu et ma supporté toute au long de
cette période, et si j'y suis arrivée c'est grâce a lui, je lui souhaite tout le bonheur
du monde et que dieu le guide toujours dans le bon chemin.*

À mes adorable petites frères YACINE et HOCINE.

*À mes beaux parent, mon beau frère et ses enfants, mes belles sœurs et leurs
enfants.*

À ma chère grand-mère que dieu nous la garde

À mes tentes et leurs enfants

*À mes amies : Meriem, lila, narimene, horia , nora, nabila, amel, fadila, avec qui
j'ai passé de bons moments agréable et inoubliable*

À ma chère binôme et amie lynda et à toute sa famille.

À toute ma promotion de RBA de 2014.



Fatma





Dédicace

J'ai le plaisir de dédier ce modeste travail :

*À celle qui s'est sacrifiée pour que je grandisse, qui a supporté mes fatigues,
me gratifiant de son affection et de son expérience patiente et irremplaçable :*

ma très chère mère.

*À celui qui a tant veillé sur mon bien, qui, patiemment forgea ma
personnalité: à mon cher père.*

À mon chère oncle : Massaoud que Dieu le gardes en bonne santé.

*À mes très chères sœurs : Khoukha, Fatiha, Nabila, Nounou, Siham, Souad,
Loubna, et la petite Amel à qui je souhaite une réussite au bac.*

À mes chères frères : AbdAlghani, Nabil, Farid, Mounir, Fouad.

À mes beaux-frères : Nacer, Karim et leur familles.

À Mes neveux : Rania, Nada, Ouassim, Soufian, Sofia

*À mes amies : Warda, Hassiba, Zuina, Lila, Fahima, Massika, Chrifa, Hanane,
Amel, Fadhila, Taous avec qui j'ai passé de bons moments agréable et inoubliable.*

À ma chère binôme et amie fatma et à toute sa famille.

À toute ma promotion de RBA de 2014.



Lynda



Sommaire

Liste des abréviations

Liste des tableaux

Liste des figures

Introduction	1
--------------------	---

Partie bibliographique

Chapitre I : Généralité sur la reproduction des bovins

I.1. Anatomie de l'appareil reproducteur mâle	3
I.1.1. Description des organes.....	3
I.1.1.1. Sélection glandulaire	3
I.1.1.2. Section tubulaire	4
I.1.1.3. Sinus uro-génital	4
I.1.2. Production du sperme	5
I.1.2.1. Spermatogenèse.....	5
I.1.2.2. Production du plasma séminal.....	6
I.2. Anatomie de l'appareil reproducteur de la femelle	7
I.2.1. Description des organes génitaux.....	7
I.2.1.1. Organes génitaux externe.....	7
I.2.1.2. Organe génitaux interne	8
I.2.2. Physiologie de la reproduction chez la vache	9
I.2.2.1. Cycle sexuel de la vache	9
I.2.2.2. Contrôle hormonal du cycle sexuel.....	12

Chapitre II : Technologie de la semence

II.1. Méthodes de récolte du sperme	14
II.1.1. Vagin artificiel	14
II.1.2. Electro- éjaculation	14
II.1.3. Massage transrectal.....	15
II.1.4. Technique de récolte de sperme épидидymaire.....	15
II.2. Evaluation de la qualité de la semence chez l'espèce bovine.....	17
II.2.1. Analyse macroscopique	17
II.2.2. Analyse microscopique	18
II.2.3. Etude physico-chimique et biochimique du sperme	23
II.3. Analyse de la motilité des spermatozoïdes.....	23
II.3.1. Estimation visuelle	23

II.3.2. Analyse par effet Doppler.....	24
II.3.3. Analyse par microphotographies	24
II.3.4. Analyse micro- cinématographique.....	24
II.3.5. Le système SQA (Sperm Quality Analyzer).....	25
II.3.6. Le système CASA (Computer Assisted Sperm Analysis)	25
Chapitre III : Caractéristique du sang des bovins	
III.1. Définition	28
III.2. Les différents composants sanguins	28
III.2.1. Les érythrocytes (ou hématies, ou globules rouges)	28
III.2.2. Les plaquettes ou thrombocytes	28
III.2.3. Les globules blancs ou les leucocytes.....	29
III.3. Le plasma	30
III.4. Le sérum	30
III.5. Le prélèvement sanguin	31
III.5.1. Sites de ponction et techniques	32
III.6. Différents types d'anticoagulants sont utilisés pour préparer le plasma.....	32

Partie pratique

Chapitre I:Matérielle et méthodes

I.1. Matériels	34
I.1.1. Matériels biologiques	34
I.1.1.1. Spermatozoïdes épидидymaire bovins:	34
I.1.1.2. plasma sanguin bovins	34
I.1.2. produits chimiques.....	35
I.1.3. Matériel d'analyse	35
I.2. méthodes	36
I.2.1. Préparation des échantillons:	36
I.2.1.1. préparation des échantillons de sperme	36
I.2.1.2. préparation des échantillons du sang	39
I.2.2. Co-incubation des différents échantillons de plasma avec le sperme	40
I.2.1.2. préparation des échantillons du sang	40
I.3. Analyse statistique	41
II. Résultats et discussions	42
II.1. Résultats	42
II.1.1. Effets des traitements	42
II.2. Discussions	50
Conclusion perspective	53

Liste des abréviations

- **ADN**:acide désoxyribonucléique
- **pH**:potentiel hydrogène
- **GnRH**:gonadotropinrelisinghormon
- **FSH**:Folliclestimulating hormone
- **LH**:Luteinising hormone
- **PGF2a**:Prostaglandine F2alpha
- **C°**:Degré celsius
- **Min**:Minute
- **ml**:Millilitre
- **CMT**:Californien MastitisTest
- **Sptz**:spermatozoïde
- **NaCl**:chlorure de sodium
- **PI**:aliquote
- **Vp**:vitesse progression
- **Pm**:poids moléculaire
- **Sec**:seconde
- **E**:enveloppes battements flagellaires
- **Fb**:fréquencebattementflagellaire
- **SQA**:spermqualityanalysé
- **CASA**:computeraided sperme analysis
- **MOT**:total spermatozoalmotility
- **PMOT**:progressivespermatozoalmobility
- **ALH**:amplitude of lateralHeatdisplacement
- **VSL**:straight line velocity
- **VCL**:curvilineanvelocity
- **BCF**: beat cross frequency
- **MAD**:meanangulardisplacement
- **STR**:rectitude

- **Lim**:linéarité
- **SCA**:Sperme Class Analyzer
- **MGG**:May Grunwald et Giemsa
- **VGM**:volume globulaire moyen
- **CCMH**:concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine.
- **Pg**: le taux d'hémoglobine et le nombre de globule rouge
- **ACD**: solution acide citrate dextrose
- **CPD**: solution citrate phosphate dextrose
- **EDTA**:Ethylène diamine-tétraacétique acide

Liste des tableaux

Tableau n°1: Classement du sperme en fonction de l'examen macroscopique.....	18
Tableau n°2: Critères de notation de la motilité massale de la semence dans l'espèce bovine.....	19
Tableau n° 3: Notes attribuées aux éjaculats suivant leur motilité individuelle, dans une grille de notation de 0 à 5.....	19
Tableau n°4: Numération formule sanguine normale du bovin adulte.....	30
Tableau n°5: résumé des différents témoins et traitements.....	41

Liste des figures

Figure n°1: Appareil génital du taureau.....	5
Figure n°2: Schéma récapitulatif de l'évolution des cellules de la lignée germinale mâle.....	6
Figure n°3: l'appareil reproducteur de la vache.....	9
Figure n°4: cycle œstral de la vache.....	11
Figure n°5: Evénements cellulaires ovariens et endocriniens du cycle œstral de la vache.....	12
Figure n°6: Schéma simplifié du mécanisme hormonal du cycle de la vache.....	13
Figure n°7: Schéma du vagin artificiel.....	14
Figure n°8: Sonde de l'électro-éjaculateur.....	15
Figure n°9: collecte de sperme avec la méthode «retrograde-flushing ».....	16
Figure n°10: cellules de Thoma	21
Figure n°11: Anomalies majeures et mineures de sptz dans l'espèce bovine.....	23
Figure n°12: Image du système SQA	26
Figure n°13: Représentation schématique des différentes vitesses mesurées par CASA.	27
Figure n°14: Les différentes compositions du sang.....	29
Figure n°15: Composition du plasma sanguin	31
Figure n°16: Schéma représentant la différence entre le plasma et le sérum.....	32
Figure n°17: Dest tubes EDTA de sang complet de vaches.....	35
Figure n°18: centrifugeuse de marque NF200.....	36
Figure n°19: analyseur informatique de marque SCA utilisé pour le calcul des vitesses de progression des spermatozoïdes.....	36
Figure n°20: Testicule après l'avoir dépourvu de la tunique vaginale.....	37
Figure n°21: Epididyme juste après sa dissection et son isolation du testicule.....	38
Figure n°22: Epididyme après l'avoir dépourvu des tissus conjonctifs.....	38
Figure n°23: Récolte de la semence par la méthode rétrograde.....	39
Figure n°24: Semence épидидymaire collectée.....	39
Figure n°25 : Evolution du pourcentage des spermatozoïdes mobiles dans les échantillons témoins en fonction du temps.....	43

Figure n°26 : Evolution du pourcentage des spermatozoïdes mobiles dans les échantillons (traitements) en fonction du temps.....	44
Figure n°27 : Evolution du pourcentage des spermatozoïdes progressifs rapides dans les échantillons témoins en fonction du temps.....	46
Figure n°28 : Effet du plasma des vaches à différents jours du cycle sur le pourcentage de spermatozoïdes progressifs rapides en fonction du temps.....	48
Figure n°29 : Evolution de la vitesse de progression linéaire (VSL) des spermatozoïdes dans les échantillons témoins en fonction du temps.....	49
Figure n°30 : Effet du plasma des vaches à différents jours du cycle sur vitesse de progression linéaire (VSL) en fonction du temps.....	50



Introduction

Introduction

Les bovins constituent une part importante de l'agriculture animale dans la plupart des pays. Depuis leur domestication il ya 9000 ans (Gautier, 2003), ils approvisionnent les populations humaines en plusieurs produits notamment le lait et la viande.

La reproduction bovine est un domaine en pleine évolution avec l'augmentation du nombre d'inséminations artificielles et le développement du transfert d'embryons. Quelque soit la méthode utilisée, l'objectif principal est d'obtenir une bonne fertilité en fin de saison. Pour cela, il est important de se soucier aussi bien de la vache que du taureau lors de l'analyse des résultats de fertilité.

Il est mondialement reconnu que la fertilité des bovins décroît à chaque année (Lucy, 2001). Plusieurs facteurs peuvent être responsables de cette baisse de fertilité : l'alimentation déficiente, la gestion inefficace des troupeaux, les conditions d'hébergement,... et parmi eux la qualité de la semence.

Donc, l'amélioration de la qualité du sperme constitue un des relais importants pour pouvoir améliorer la fertilité.

La relation de la qualité du sperme à la fertilité a fait l'objet de nombreuses études (Amann, 1989 ; Amann *et al.*, 1993 ; Bratton *et al.*, 1956...etc.). En outre, ces études se sont intéressées aux facteurs qui affectent la qualité de la semence et particulièrement ceux qui agissent sur les paramètres de la mobilité qui conditionnent le pouvoir fécondant des spermatozoïdes.

Chez l'homme, Différentes molécules ont été démontrées en tant que facteurs qui influencent sur la mobilité spermatique tels que la caféine, la théophylline et le pentoxifylline (Sharma *et al.*, 1996 ; Stachecki *et al.*, 1994).

D'autres études ont exploré l'influence du plasma sanguin femelle 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) et chez le chien (Iguerouda et Verstegen, 2001) et ont démontré ses effets positifs.

Notre travail s'inscrit dans cette optique, à savoir, l'étude de l'effet du plasma sur les paramètres de la mobilité du sperme, chez le bovin et l'exploration de l'influence du jour du cycle oestral de la vache sur ces paramètres.



Partie bibliographique



Chapitre I

I.1. Anatomie de l'appareil reproducteur de taureau :

I.1.1. Description des organes:

L'appareil génital mâle est formé par l'ensemble des organes chargés de l'élaboration du sperme et du dépôt de celui-ci 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.

I.1.1.1. Sélection glandulaire:

Comprenant deux gonades: « les testicules », et les glandes annexes

a. Testicules:

Les testicules sont des organes pairs doués d'une double fonction: gamétogénèse et endocrine. La fonction gamétogénèse, ou spermatogénèse, assimilable à une véritable fonction exocrine, est assurée par les tubes séminifères, et une 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 grammes 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'origines très différentes, en surface se trouve le scrotum et en profondeur se trouve le muscle crémaster. (Vaissaire, 1977 ; Barone, 1978 ; Bonnes et al, 2005).

Plus profondément chaque testicule est revêtu d'une capsule fibreuse, l'albuginée, qui s'enfonce dans la profondeur du testicule pour constituer le corps de Highmore, perforé par des vaisseaux, et le rete testis. Entre l'albuginée et le corps de Highmore sont tendues des cloisons, souvent incomplètes qui délimitent environ deux à trois cents lobules testiculaires, chacun contenant 1 à 4 tubes séminifères (Dadoune et Demoulin, 2001).

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 bulbo-urétrales). (Charles T et Levasseur M.C, 2001).

I.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 très contourné qui forme des lobules séparés par des travées conjonctives présente trois grands segments anatomiques : la région antérieure ou tête, la région médiane ou corps et la région postérieure ou caudale (Dacheux et F et 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 présentent 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:

Faisant suite au canal épидидymaire, ce canal s'engage dans le trajet inguinal où il contribue à former le cordon testiculaire, il pénètre dans la cavité abdominale et 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).

I.1.1.3. Sinus uro-génital:

Comprenant l'urètre et l'appareil copulateur ; le pénis.

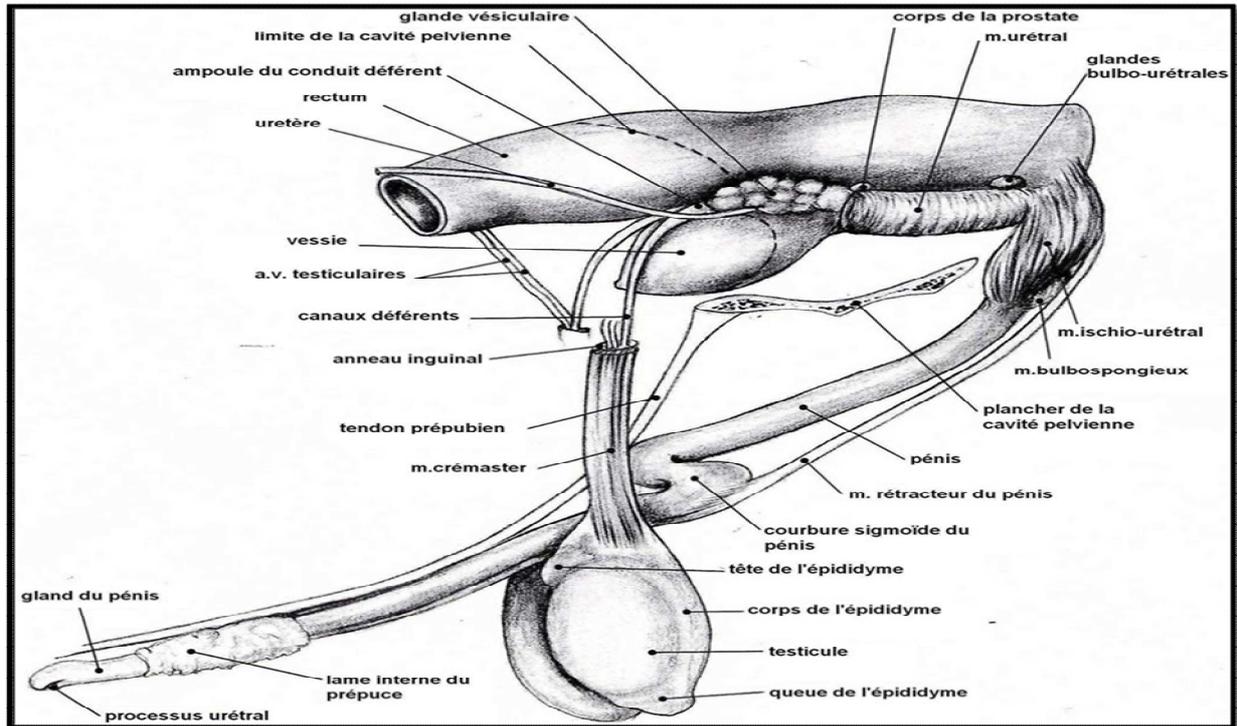


Figure n° 1: Appareil génital du taureau (constantinesca, 2004).

I.1.2. Production du sperme:

Le sperme est un produit de sécrétion élaboré au cours de la progression des spermatozoïdes dans les différentes parties du tractus génital. Il comprend les spermatozoïdes et le plasma séminal (Charles T et Levasseur M.C, 2001).

I.1.2.1. Spermatogénèse:

La spermatogénèse peut être répartie en deux étapes successives :

- la première étape comprend les cellules allant de la spermatogonie au spermatocyte secondaire inclus : elle est appelée **spermatogénèse**.
- la seconde étape comprend la différenciation/maturation des spermatozoïdes à partir de spermatide : elle est appelée **spermiogénèse**

La spermatogénèse est initié par une série de divisions mitotiques de cellules souches diploïdes de type A1 en cellules de type A2; les cellules de type A2 se divisent pour devenir les type A3, qui elles aboutissent en cellules souches de type A4. Celles-ci ont la capacité, soit de produire de nouvelles cellules de type A1, afin de maintenir la population de cellules souches mâles, ou alors de poursuivre leur

cheminement et devenir des spermatogonies intermédiaires différenciées (type cellulaire B) (Dym, 1994).

Au stade des cellules de type B, ou spermatocytes, entre en jeu la phase méiotique (Marieb et Laurendeau, 1993). C'est la deuxième phase de la spermatogénèse, par laquelle les spermatocytes se divisent par méiose pour donner des spermatides haploïdes suite à deux divisions nucléaires.

Finalement, la troisième phase spermatogénique est la spermiogénèse. Par ce procédé complexe de différenciations morphologiques et fonctionnelles, les spermatides rondes se différencient, sans division cellulaire supplémentaire, en spermatozoïdes morphologiquement complets (Matsumoto, 1996).

La durée de la spermatogénèse est d'environ 54 jours chez le taureau. La durée moyenne de transit dans l'épididyme est de 8 jours (Hochereau *et al.*, 1964).

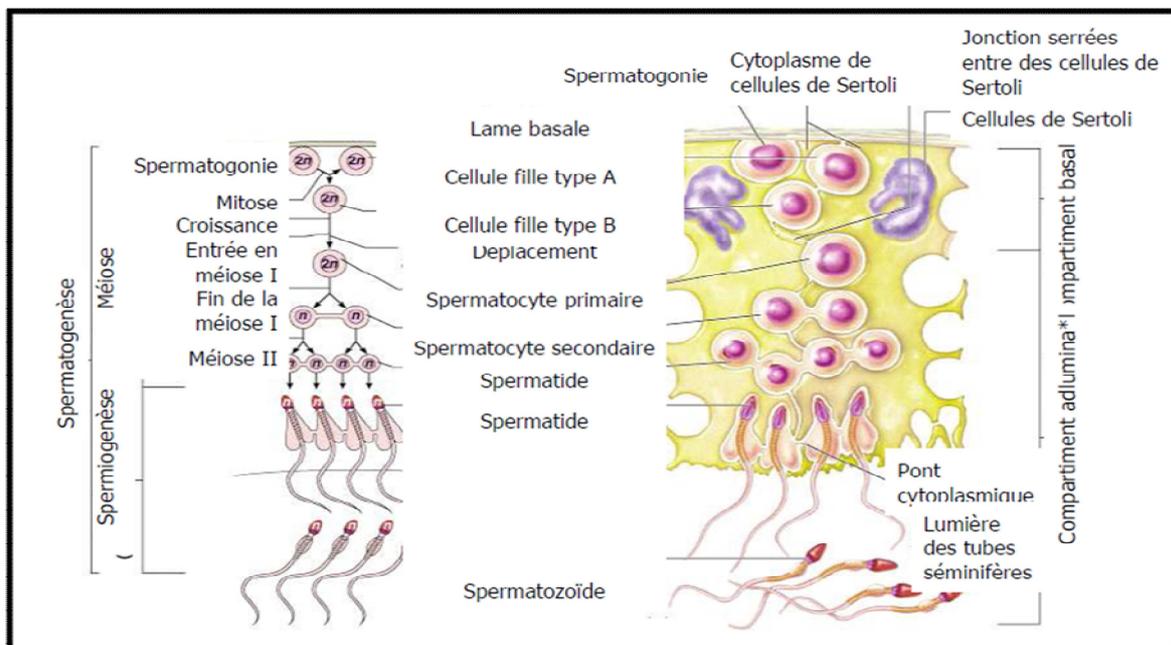


Figure n° 2: Schéma récapitulatif de l'évolution des cellules de la lignée germinale mâle (Gayraud, 2007).

I.1.2.2. Production du plasma séminal:

Les glandes annexes, tout au long du canal déférent, assurent la formation du plasma séminal et donc du sperme définitif. Les vésicules séminales sécrètent du fructose, qui est la principale source d'énergie des spermatozoïdes, ainsi que des phosphates, des citrates... La prostate permet une alcalinisation du sperme par

sécrétion d'un liquide à pH = 8, contenant des phospholipides, des bases azotées et des ions divers (Dacheux F et Dacheux J.L. 2001).

I.2. Anatomie de l'appareil reproducteur de la vache

I.2.1. Description des organes génitaux:

L'appareil génital femelle est l'ensemble des organes qui élaborent les gamètes femelles et les hormones sexuelles, qui sont le siège de la fécondation et qui assurent le développement de l'œuf au cours de la gestation.

Les organes génitaux sont divisés en organes génitaux internes et externes.

I.2.1.1. Organes génitaux externe:

a. Vulve:

La vulve est la partie externe de l'appareil génital, elle se compose de deux lèvres musculeuses qui s'ouvrent ventralement à l'anus. Ces lèvres sont verticales épaisses et revêtues extérieurement d'une peau un peu ridée et pourvue de poils fin et courts (Barone R, 2001).

Riche en glandes sébacées, doublée d'un muscle constricteur postérieur puissant, et de deux glandes spéciales, dites vulvo vaginales et appelées glandes de BARTHOLIN. Ces glandes sécrètent un liquide visqueux particulièrement abondant au moment des chaleurs (Bressou, 1978).

b. Vestibule du vagin:

En écartant la vulve, on voit apparaître le vestibule du vagin, d'une longueur d'environ 10 cm, qui conduit dans le vagin. Le vestibule se termine à la hauteur de l'orifice de l'urètre, qui débouche dans le plancher du vagin, et qui sépare les deux secteurs. Dans les parois du vestibule se trouvent des glandes spéciales qui sécrètent les odeurs sexuelles attractives (phéromones) et les éliminent dans l'urine et le mucus (kohler S, 2004).

c. Vagin:

Il correspond à la portion des voies génitales femelles qui va recevoir l'organe copulateur du mâle. Il est séparé du vestibule du vagin par une membrane (l'hymen) (Gayrard V, 2007).

Le vagin est un tube de 25-30 cm de long qui se trouve dans la cavité pelvienne. A l'avant, le vagin se termine par le col de l'utérus (cervix). (kohler S, 2004).

I.2.1.2. Organe génitaux interne:

a. Col de l'utérus:

Le col de l'utérus relie le corps de la matrice avec le vagin. Il se délimite à une extrémité par l'orifice interne de la matrice (côté corps de la matrice) et à l'autre extrémité par l'orifice externe de la matrice (côté vagin) (kohler S, 2004).

Il est long de 5 à 6 cm avant la puberté et d'une dizaine de centimètres chez l'adulte. Son calibre varie de 4 à 6 cm et ses parois sont épaisses de 20 à 25 mm (Crevier N, 1995).

b. Matrice (Utérus):

L'utérus ou matrice se compose de deux cornes, d'un corps et d'un col. Les deux cornes utérines s'unissent pour former le corps utérin. Celui-ci est court, de 5 cm de longueur environ (Parez et Duplan, 1987).

La taille et la constitution de l'utérus et du col de l'utérus dépendent fortement de l'âge de l'animal (nombre de gestations) et de la phase du cycle sexuel (kohler S, 2004).

c. Oviductes

Par définition, l'oviducte est le canal reliant l'ovaire à l'utérus, Connus aussi sous les noms trompes de Fallope ou trompes utérines, ce sont l'endroit où a lieu la rencontre d'une cellule haploïde mâle et d'une cellule haploïde femelle pour permettre la formation d'un zygote diploïde (Gauvreau D, 2008). Ils sont au nombre de deux chez les mammifères et sont retrouvés au bout de chaque corne utérine, chaque oviducte se divise en cinq sections dont le pavillon, l'ampoule, la jonction isthme-ampoule, l'isthme et la jonction utéro-tubaire (Hafez et Blandau, 1969).

Ils se situent en prolongement des cornes utérines. Leur longueur varie de 15 à 25 cm. Leur diamètre est de 1-2 mm (kohler S, 2004).

d. Ovaires

L'ovaire est la glande génitale de la femelle. C'est un organe pair, appendu à la région lombaire et pourvu d'une double fonction : gamétogénèse, assurant l'ovogénèse, et endocrine, commandant (sous le contrôle de l'hypophyse) toute l'activité génitale par la sécrétion des hormones œstrogène et progestative.

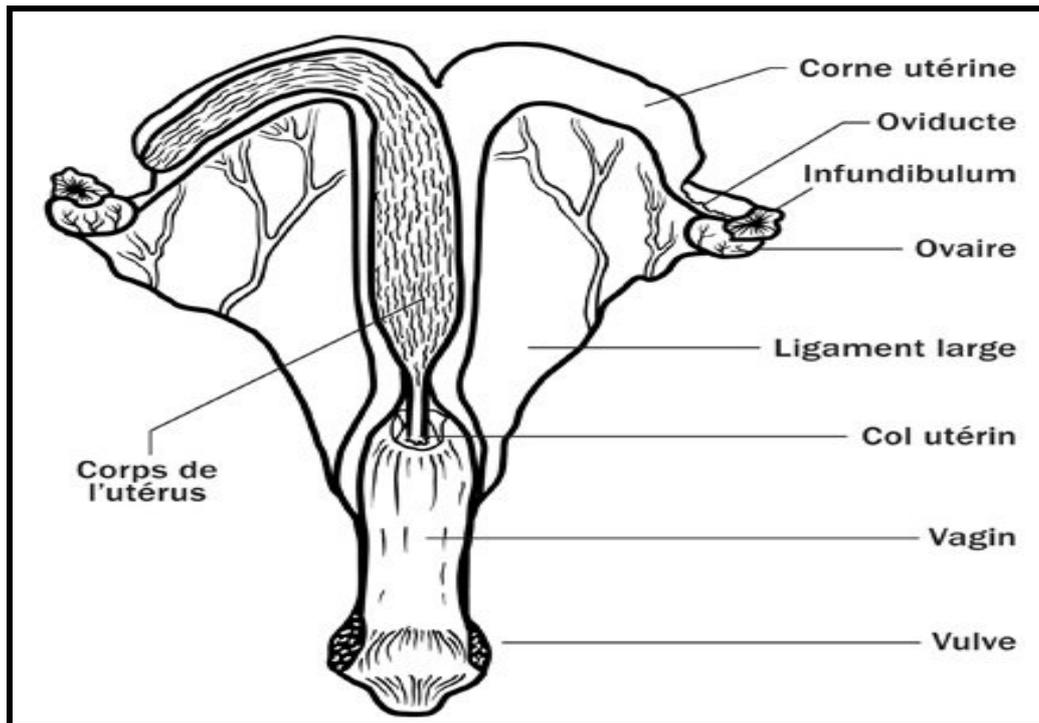


Figure n° 3: Appareil reproducteur de la vache.

I.2.2. Physiologie de la reproduction chez la vache:

I.2.2.1. Cycle sexuel de la vache:

La vache est une espèce polyœstrienne continue à ovulation spontanée. Au cours de chaque période sexuelle, les cycles se succèdent tant qu'une gestation n'a pas lieu et ceci quelle que soit la période de l'année (Derivaux, 1971).

La durée du cycle œstral est de 21 jours en moyenne mais varie selon les animaux, elle est la plupart du temps comprise entre 17 et 25 jours (Stevenson, 2007).

Trois composantes caractérisent le cycle sexuel chez la vache : une composante cellulaire ; une composante comportementale ou psychique ; une composante hormonale.

a. Composante cellulaire du cycle sexuel:

Elle traduit l'ensemble des phénomènes cellulaires cycliques qui se produisent au niveau de l'ovaire, avec un événement exceptionnel qui est l'ovulation.

Le cycle ovarien se définit comme l'intervalle entre deux ovulations. Celles-ci se caractérisent par la succession d'une phase folliculaire conduisant à l'ovulation et une phase lutéale (Verssaire, 1977).

- **Phase folliculaire:**

Qui correspond à la période qui s'étend de la fin de la croissance folliculaire à l'ovulation (Gayrard V, 2007).

Elle est caractérisée par la sécrétion des œstrogènes par les cellules de la thèque interne du follicule ovarien. Cette phase folliculaire se divise en pro-œstrus et œstrus (Nishimwi, 2008).

- **Pro-œstrus (avant l'oestrus):**

Cette période dure environ 3 à 4 jours chez la vache. Elle est caractérisée par les processus de croissance et maturation folliculaire qui amènent un follicule du stock cavitaire au stade de follicule mûr. C'est également pendant cette période que se termine la lyse du corps jaune du cycle précédent.

- **Oestrus ou chaleurs:**

(Heape, 1900) est le premier à avoir utilisé le terme « œstrus » (adaptation latine mot grec oistros) pour désigner la période d'acceptation du mâle (Gayrard V, 2007).

C'est la période de maturité folliculaire suivie de l'ovulation. Elle se caractérise par des modifications comportementales dites chaleurs ; période où la femelle accepte le chevauchement par le mâle ou par ses congénères. Sa durée est brève chez la vache ; environ 13 à 23 heures (Cisse, 1991).

- **Phase lutéale:**

Qui débute après l'ovulation et s'achève avec la régression du ou des corps jaune (phases de metoestrus et dioestrus) (Gayrard V, 2007).

La phase lutéale est caractérisée par la sécrétion de la progestérone par le corps jaune. Cette phase comporte également deux étapes (le metoestrus et le dioestrus). (Nishimwi K, 2008).

- **Met-œstrus ou post oestrus:**

Cette période appelée aussi post-œstrus correspond à la formation et au développement du corps jaune. Cette étape a une durée d'environ quatre (4) jours chez la vache.

- **Di-œstrus:**

Cette étape correspond à la période de fonctionnement du corps jaune, avec l'installation d'un état gravidique par le biais de la sécrétion de la progestérone.

Cette étape a une durée d'environ 10 à 15 jours. Dans certains cas, cette étape peut se prolonger. Il devient alors un anoestrus ou repos sexuel qui peut être :

saisonnier, lié à la période défavorable au disponible fourrager, de gestation, ou de postpartum.

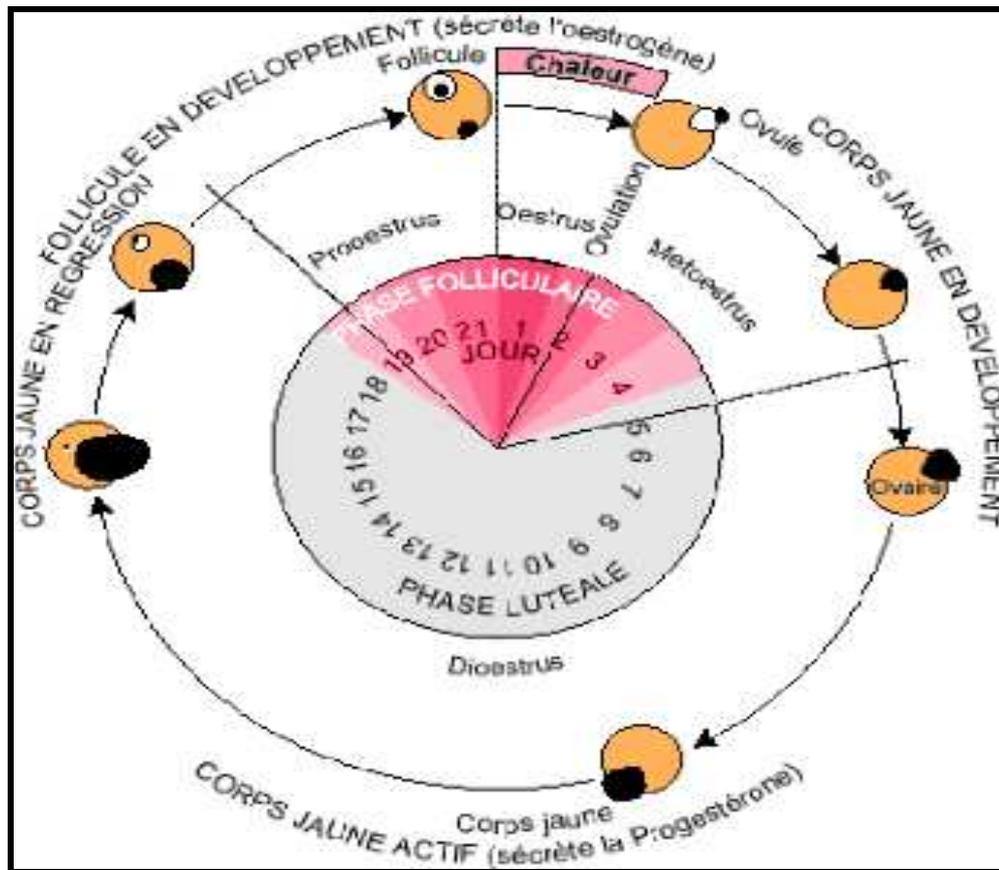


Figure n° 4: Cycle œstral de la vache (Wattiaux, 2006).

b. Composante comportementale :

Les modifications de comportement sont des indices les plus importants à considérer dans la pratique parce qu'étant les seuls visibles du cycle. En effet, l'œstrus est la seule phase visible du cycle sexuel de la vache et se caractérise par l'acceptation du chevauchement (Thibier, 1976). Par ailleurs, des signes secondaires sont parfois observés. Il s'agit : de la tuméfaction vulvaire ; du beuglement ; de l'agitation ; d'un écoulement d'une glaire translucide.

Au toucher rectal, l'inséminateur expérimenté constate la plupart du temps une augmentation de la tonicité de l'utérus (état de tension accru). (kohler S, 2004).

c. Composante hormonale:

Les événements cellulaires du cycle sexuel de la vache sont sous contrôle hormonal. Ainsi, assurent le complexe hypothalamo- hypophysaire, l'ovaire et l'utérus, par les sécrétions hormonales, la régulation du cycle sexuel de la vache. Ce mécanisme hormonal fait intervenir trois groupes d'hormones :

- Les hormones hypothalamiques Il s'agit essentiellement de la Gonadolibérine ou GnRH.
- Les hormones hypophysaires ou hormones gonadotropes Il s'agit de la FSH qui intervient dans la croissance et la maturation folliculaire et la LH qui intervient dans la maturation des follicules, l'ovulation et la lutéinisation des follicules (Fieni *et al.* 1995).
- Les œstrogènes sont sécrétés principalement par les follicules ovariens. (Bruyas, 1991).

La progestérone est sécrétée essentiellement par le corps jaune. Elle est également synthétisée par la corticosurrénale et le placenta de certains mammifères. (Thibier *et al.*, 1973) En dehors de ces trois groupes d'hormones, la PGF2 α d'origine utérine a une activité lutéolytique. Elle assure la régression du corps jaune et participe ainsi à la régulation du cycle sexuel.

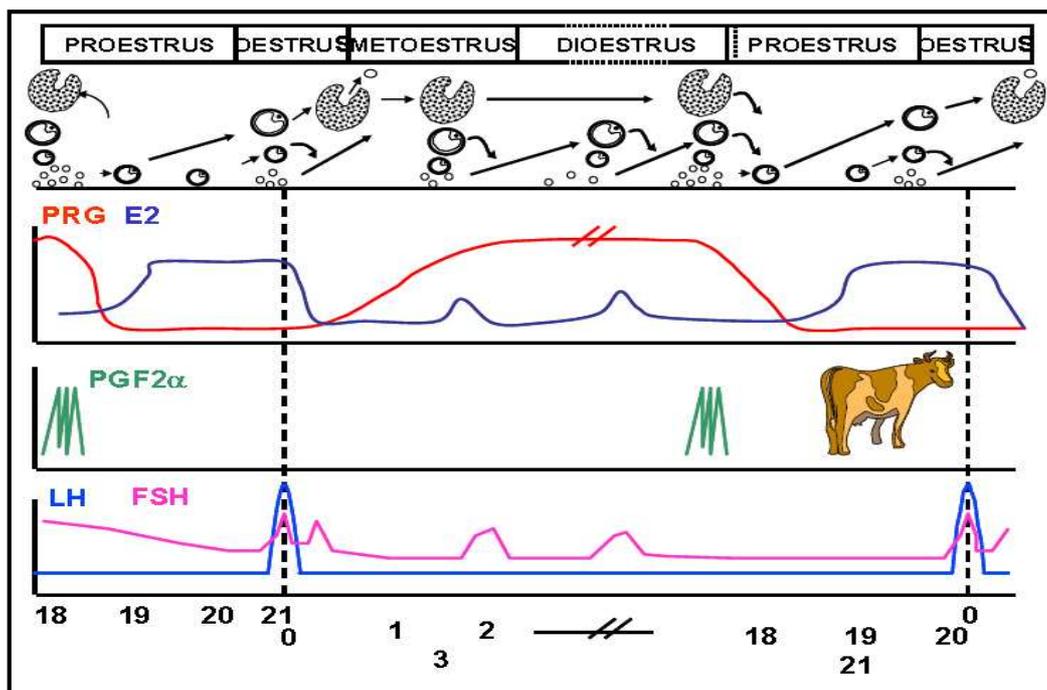


Figure n° 5: Événements cellulaires ovariens et endocriniens du cycle œstral de la vache (Gayrard, 2007).

I.2.2.2. Contrôle hormonal du cycle sexuel:

Les hormones hypophysaires et ovariennes interagissent les unes avec les autres sous le contrôle du complexe hypothalamo-hypophysaire, assurant ainsi la régulation du cycle sexuel. Les principales actions hormonales sont les suivantes :

- Sous l'influence de la GnRH, L'hypophyse libère la FSH et la LH.

- FSH stimule la croissance des follicules sur l'ovaire ; Ceux-ci produisent alors de l'œstrogène.
- Les œstrogènes permettent l'apparition du comportement d'œstrus.
- L'augmentation de la concentration d'œstrogène va accentuer la sécrétion de GnRH par l'hypothalamus.
- Pour finir, le follicule en croissance parvient à l'ovulation sous l'influence de la LH.
- La concentration d'œstrogène diminue et, avec elle, la sécrétion de GnRH.
- Le corps jaune en croissance produit maintenant de la progestérone.
- Celle-ci bloque la sécrétion de GnRH par l'hypothalamus, ainsi que de FSH et de LH par l'hypophyse.
- Si la gestation n'a pas lieu, il y a formation de prostaglandine (PGF) dans la muqueuse de l'utérus.
- Cette dernière (la PGF) dissout le corps jaune, ce qui a pour conséquence de diminuer la concentration de progestérone.
- Ainsi, l'hypothalamus peut recommencer de sécréter de la GnRH (kohler S ,2004).

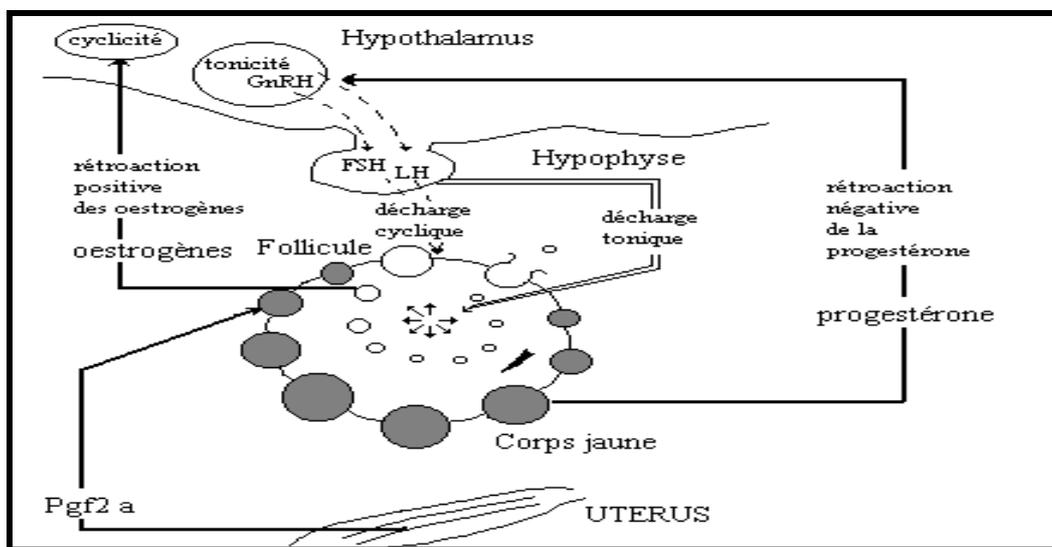


Figure n° 6: Schéma simplifié du mécanisme hormonal du cycle de la vache (Pathologie de la reproduction ENVA, 2000).



Chapitre II

II.1. Méthodes de récolte du sperme:

La récolte du sperme constitue la première opération pour son examen. Le vagin artificiel constitue le moyen classiquement utilisé chez les bovins. L'électro-éjaculation est également d'application. Enfin, citons la récolte de sperme par massage des vésicules séminales du taureau.

II.1.1. Vagin artificiel:

Le vagin artificiel comporte trois parties : une partie externe rigide d'un diamètre de 6.5 cm et une longueur comprise entre 26 et 40 cm selon l'âge de l'animal ; une partie interne constitué d'un manchon en caoutchouc de 50 cm de long et un cône récepteur en caoutchouc sur lequel sera fixé le tube collecteur. L'ensemble sera fixé au moyen de deux lanières en caoutchouc. Une extrémité du vagin artificiel est lubrifiée : elle servira à introduire le pénis. Dans cette espèce, la température de l'eau de remplissage (40°C) est plus importante que la pression.

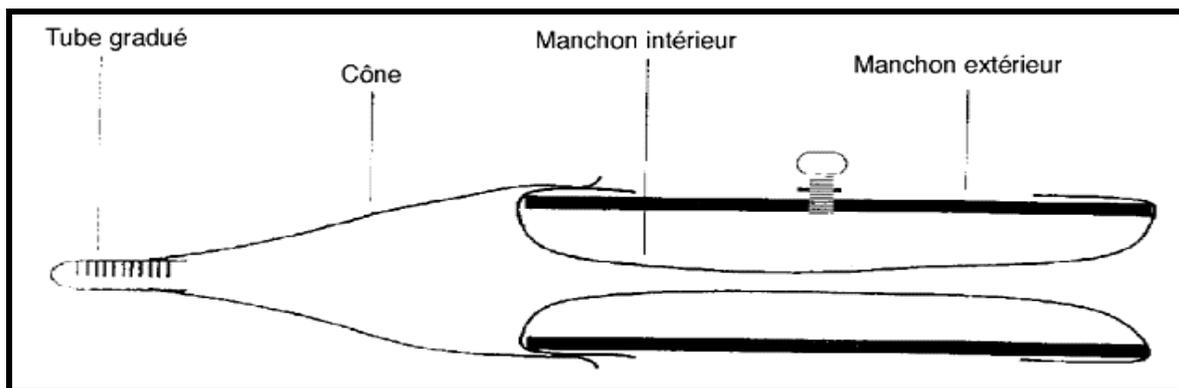


Figure n° 7: Schéma du vagin artificiel (Barret, 1992).

II.1.2. Electro-éjaculation:

Peu utilisée, la méthode est le plus souvent appliquée aux animaux qui faute d'érections normales, de lésions articulaires ou du refus du vagin artificiel ne peuvent être récoltés au moyen d'un vagin artificiel.

L'électro-éjaculation consiste à provoquer l'émission de sperme par l'excitation électrique des nerfs érecteurs et éjaculateurs. Elle est réalisée sur animal debout ou couché. La durée totale est comprise entre 5 et 10 min et le volume collectée entre 10 et 30 ml. Il existe divers types d'électro-éjaculateurs. Leur choix dépend largement de préférences personnelles (Hanzen C, 2008).



Figure n° 8 : Sonde de l'électro-éjaculateur.

II.1.3. 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 (Hanzen, 2008).

II.1.4. Technique de récolte de sperme épидидymaire:

On peut prélever du sperme épидидymaire d'un animal vivant sous anesthésie générale avec une intervention chirurgicale. Le principe consiste à faire une microponction du canal déférent en lui introduisant un petit tube (canule) 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 sauvage :

a. Méthode de découpage « cuttingmetod »

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

b. Méthode « float-up »

Cette méthodes consiste à incisé la partie caudale de l'épididyme et du canal déférent avec un scalpel dans une boite 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 lavée 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 caudale (Martinez-Pasteur *et al.*, 2006).

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

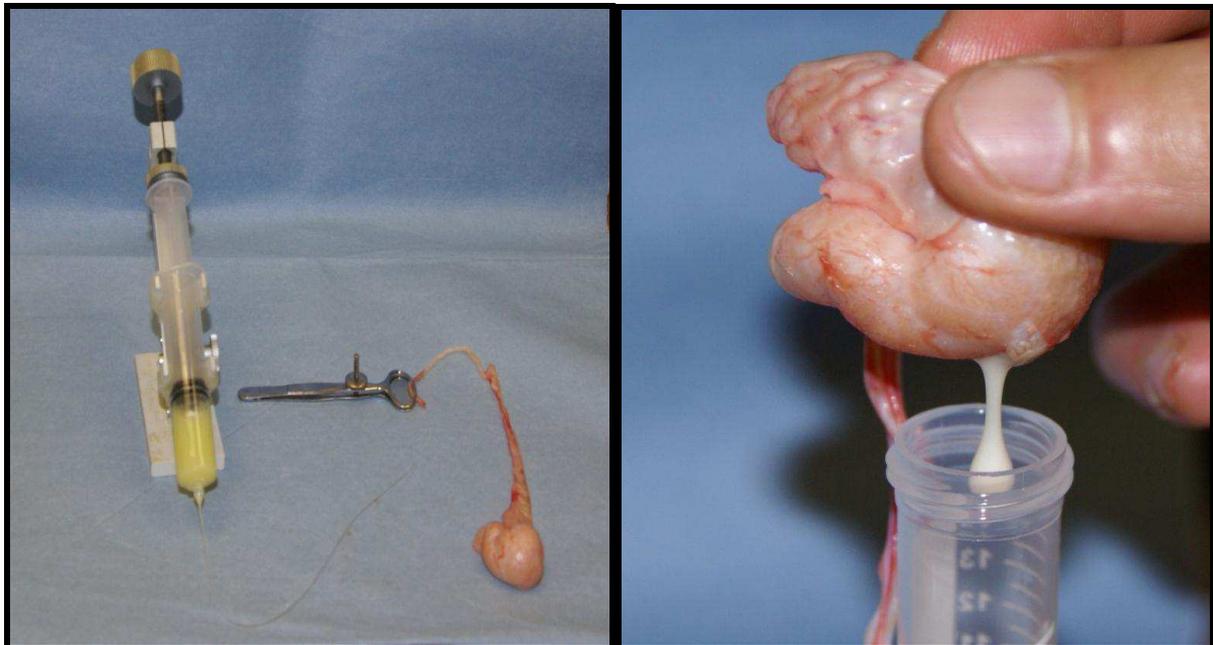


Figure n° 9: Collecte de sperme avec la méthode «retrograde-flushing »
(Stout. 2012).

II.2. Evaluation de la qualité de la semence chez l'espèce bovine:

L'évaluation de la qualité du sperme d'un animal vise en fait à atteindre trois objectifs : le premier est d'identifier les animaux infertiles, le second est d'évaluer la fertilité d'un animal antérieurement infertile et le troisième à détecter les animaux dont la fertilité est supérieure.

Classiquement, la détermination de la qualité du sperme en suppose le prélèvement préalable et ensuite l'évaluation de divers paramètres d'examen macroscopique, microscopique ou biochimique de valeur inégale dont seule la concordance permet de tirer des conclusions valables.

II.2.1. Analyse macroscopique:

Immédiatement après la récolte, on procède à un examen visuel du sperme dans le tube de récolte qui permet d'apprécier le volume, la couleur et la consistance de l'éjaculat.

a. Volume:

Le volume de semence recueilli par vagin artificiel varie en fonction de l'âge, de la race, de la préparation du taureau, de l'alimentation et pour un même taureau, des facteurs psychiques et environnementaux. Le volume varie entre les valeurs extrêmes de 0,5 à 14 ml avec une moyenne de 4 ml (Parez et Duplan, 1987). Le volume est mesuré le plus souvent par lecture directe du tube de collecte.

b. Couleur:

Chez le taureau, la couleur normale du sperme est dans la plupart des cas ivoire-crème ou blanc-laiteux, 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).

c. Viscosité:

La viscosité est corrélée à la concentration en spermatozoïdes, en effet l'éjaculat est d'autant plus visqueux que le nombre de spermatozoïdes est élevé. 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 C, 2008).

Tableau n° 1: Classement du sperme en fonction de l'examen macroscopique : Recommandations de la société de Theriogenology (Elmore, 1985).

Couleur	Turbidité	Consistance et viscosité	Concentration prévue en sptz par ml	Qualité attribuée au sperme
Blanc	Opaque	Crémeuse et visqueuse	750 millions à 2 milliards	Très bonne
Blanc	Opaque	faiblement visqueuse	400 à 750 millions	Bonne
Blanc sale	Légèrement translucide	Laitieuse	250 à 400 millions	Assez bonne à moyenne
Grisâtre	Translucide	Aqueuse	Inférieure à 200 millions	Mauvaise

d. pH et poids spécifique:

La 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.

Le poids spécifique dépend du rapport entre la concentration en spermatozoïdes et le volume du plasma séminal. Il est de 1.035 chez le taureau.

e. Recherche des polynucléaires:

Il est possible de réaliser sur le sperme le test de Schalm (CMT). Pour ce faire 0.5 ml de sperme sera mélangé à 2.5 ml de Teepol. Le degré de gélification sera noté.

II.2.2.Examens microscopiques:

L'examen microscopique sera réalisé dans les minutes suivant le prélèvement et selon la nature des examens en respectant les conditions thermiques optimales.

L'examen microscopique permettra et notamment de poser le diagnostic de l'une ou l'autre anomalie.

a. Motilité:

C'est un élément d'appréciation de la vie ou de la mort des sptz et de leur niveau de vivacité. Elle peut porter sur la semence globale après récolte (motilité massale et motilité individuelle).

- Motilité massale:

La motilité massale est évaluée immédiatement après la collecte du sperme. L'éjaculat est maintenu à une température de 37°C et l'examen est réalisé sur une platine chauffée à 37°C.

Tableau n° 2: Critères de notation de la motilité massale de la semence dans l'espèce bovine (Cabannes C.R, 2008).

Note	Nature et intensité du mouvement
0	Aucun mouvement a la surface de la goutte
1	Léger mouvement a la surface de la goutte
2	Mouvement net mais ne formant pas de vague
3	Début de vague
4	Vague très nettes
5	Tourbillons nettement visibles

- Motilité individuelle:

L'évaluation de la motilité individuelle vise à évaluer le pourcentage de sptz motiles, c'est à dire ayant une mobilité propre et non pas se mouvant de façon passive (Dumont, 1997).

Tableau n° 3: Notes attribuées aux éjaculats suivant leur motilité individuelle, dans une grille de notation de 0 à 5.

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

Il existe maintenant des analyseurs automatisés de la mobilité des spermatozoïdes associés à des logiciels d'analyse d'image.

(Voir plus de détails au-dessous dans la partie : **Analyse de la motilité des spermatozoïdes**).

b. Concentration en spermatozoïdes:

La concentration en sptz de l'éjaculat permet de déterminer le taux de dilution adapté pour la réalisation de paillettes de semence congelée utilisées pour IA. Dans les Coopératives d'élevage et d'insémination Animale, on a le plus souvent recours à des méthodes indirectes d'estimation de la concentration, comme la néphélométrie (Dumont, 1997). On mesure l'absorption d'un flux lumineux à travers les spermatozoïdes dilués à l'aide d'un spectrophotomètre à la longueur d'onde de 535 nm. En pratique, un échantillon de 20 ou de 40 microlitres de sperme est dilué dans du sérum physiologique pour obtenir un volume final de 1ml dans la cuvette du spectrophotomètre. Le rapport de la densité optique finale sur la densité optique émise est corrélé à la concentration en sptz de l'échantillon considéré.

Pour les taureaux dont le plasma séminal est naturellement coloré ou pour ceux dont la semence contient des cellules non germinales, la concentration peut être surestimée.

– Utilisation de la cellule hématimétrique:

Il s'agit de la méthode la moins chère pour déterminer la concentration en sptz de l'éjaculat et consiste en un comptage direct des sptz observés individuellement.

L'utilisation de la cellule hématimétrique (cellule de Thoma ou cellule de Malassez) est assez fiable lorsque la dilution (en général au 1/100^{ème}) est faite de façon précise à l'aide d'une pipette de dilution pour le comptage des leucocytes et des plaquettes (l'Unopette system®).

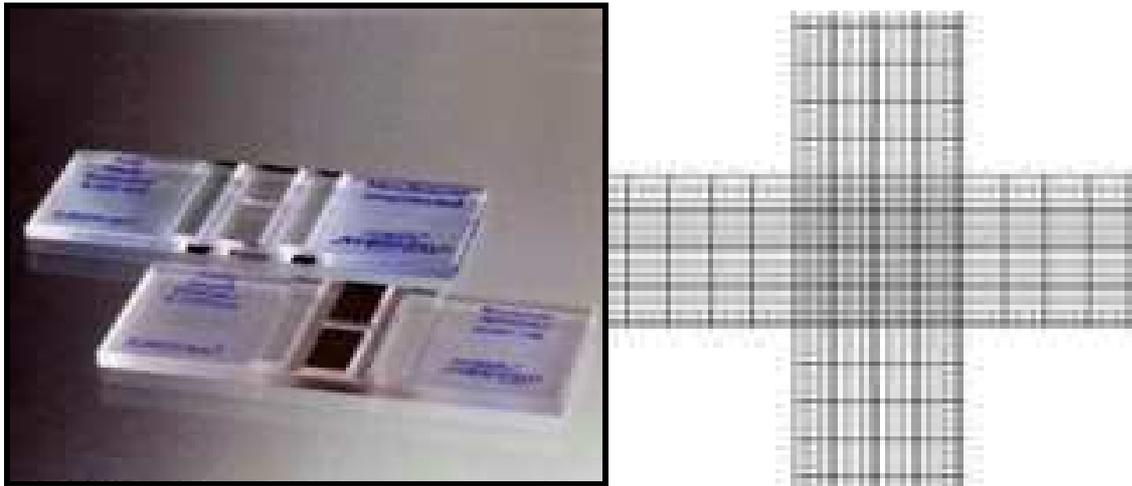


Figure n° 10: Cellules de Thoma (les laboratoires Fiers)

– **Utilisation du spectrophotomètre:**

Cette technique est basée sur la corrélation entre la densité optique d'un échantillon de sperme diluée et sa concentration. Les spectrophotomètres peuvent être plus ou moins sophistiqués et doivent être calibrés pour le sperme de bovin. La courbe standard est généralement établie à l'aide de dilutions sériées d'un échantillon donné dont la concentration est calculée à l'aide d'une cellule hématimétrique. L'appareil est calibré pour une utilisation avec une lumière d'une longueur d'onde de 535 nm. Un réétalonnage régulier des appareils est nécessaire. (Tibary *et al.*, 2005 et Blanchard *et al.*, 2003).

– **Utilisation du compteur de particules:**

La concentration du sperme peut être déterminée à l'aide d'un appareil comptant des particules de taille connue « Coulter counter » tels que le SpermCue®, le modèle 10 spermcounter® ou le Micro-Reader®). Cette méthode est surtout utilisée dans les laboratoires de recherche. Les analyseurs informatisés de la semence sont capables de donner la concentration de l'échantillon lorsque le volume utilisé est précis et l'appareil bien calibré (Tibary *et al.*, 2005 ; Blanchard *et al.*, 2003).

c. Pourcentage de spermatozoïdes vivants:

Le pourcentage de spermatozoïdes vivants est apprécié de façon approximative, au microscope optique, cette valeur est fortement corrélée à la qualité du mouvement. Cette estimation est subjective et dépend fortement de l'expérience de l'opérateur. L'examen s'effectue de manière plus aisée sur frottis coloré à

l'éosine-nigrosine, en effet, les sptz dont la membrane est endommagée laissent pénétrer le colorant et apparaissent donc roses (éosine) sur fond bleu (nigrosine) alors que les spermatozoïdes vivants ont une membrane intacte et apparaissent donc incolores. (Hanzen, C 2008).

d. Morphologie des spermatozoïdes:

L'examen de la morphologie est effectué sur les jeunes taureaux, avant la phase de testage pour évaluer la fonction sexuelle du futur taureau reproducteur. Ensuite, pour les taureaux sélectionnés dans la filière de l'insémination artificielle.

En pratique, l'examen morphologique des sptz, consiste en l'observation au microscope optique. Sous microscope à contraste de phase ou sous immersion (grossissement x 400 à 600), les anomalies sont comptées sur au moins 200 spermatozoïdes.

On distingue trois types de classifications de la morphologie des spermatozoïdes.

- La première dépend du site de dysfonctionnement et sépare les anomalies en anomalies primaires et secondaires. La désignation d'anomalie primaire est réservée à des anomalies se produisant lors de la spermatogénèse (à l'intérieur des tubes séminifères) et les anomalies secondaires surviennent après la spermatogénèse durant la maturation épидидymaire voire lors de l'éjaculation.

- La seconde classification est fonction de la répercussion des anomalies des sptz sur la fertilité des taureaux. Elle a été proposée par Blom en 1973.

- Et le troisième type est basé sur la localisation de l'anomalie sur les sptz (anomalie de tête, de pièce intermédiaire, de flagelle).

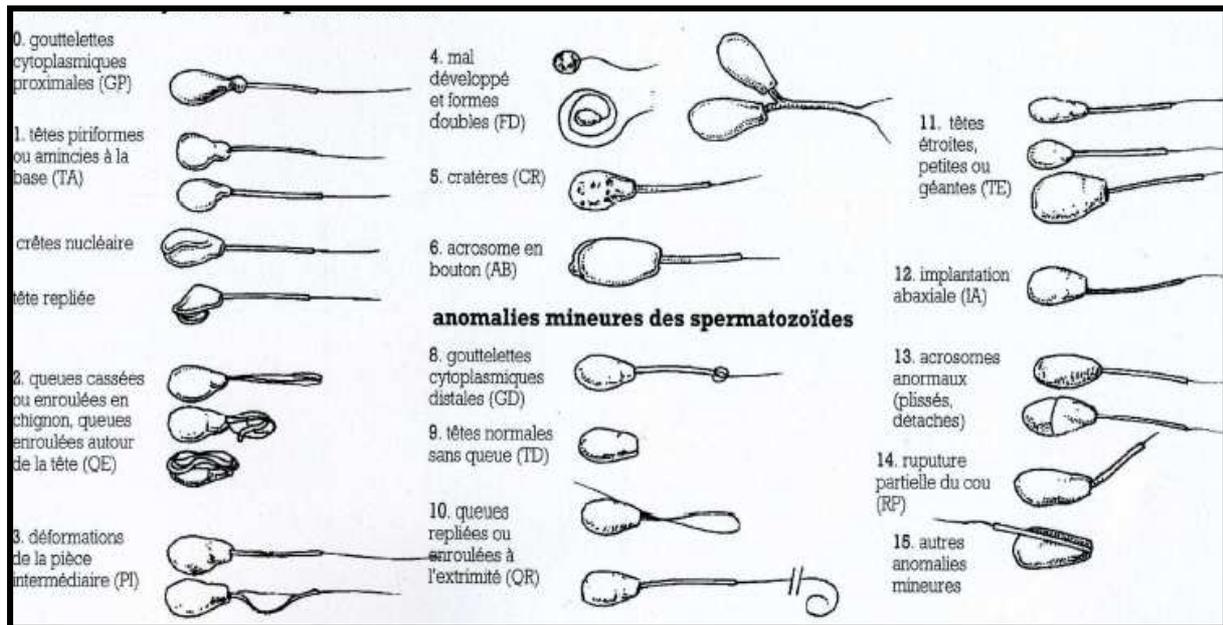


Figure n° 11: Anomalies majeures et mineures de spermatozoïdes dans l'espèce bovine (Dumont, 1997).

II.2.3. Etude physico-chimique et biochimique du sperme:

L'activité métabolique des sptz est un important indicateur de la qualité du sperme. L'évaluation peut se faire par plusieurs moyens tels que la mesure du pH (Derivaux, 1971), l'indice de fructolyse, la réduction du bleu de méthylène, le test de résistance au NaCl, l'oxydation du pyruvate (Melrose et Turner, 1952), la réduction de la résazurine, etc. Le pH normal du sperme est proche de la neutralité (pH=7) avec de faibles variations (6,8 à 7,2). Mais plusieurs auteurs cités par (Traore, 1996) préconisent qu'il est légèrement acide car le pH peut descendre à 6,5.

II.3. Analyse de la motilité des spermatozoïdes:

La motilité des sptz a été examinée par quatre techniques subjectives et objectives.

II.3.1. Estimation visuelle:

- Le pourcentage de sptz motiles et progressifs a été estimé de façon subjective au microscope à contraste de phase

II.3.2. Analyse par effet Doppler:

Le pourcentage des sptz a été apprécié de façon objective par la méthode utilisant une source laser et un système de mesure de la variation, par effet Doppler, de la longueur d'onde de la lumière diffusée par les sptz mobiles (Spermokinésimètre commercialisé par SORO Arcueil F). Les résultats concernant la validité de cet appareil ont été décrits par (Paquignon *et al.*, 1983).

II.3.3. Analyse par microphotographies:

Des clichés photographiques (24 x 36 mm) ont été pris en poses d'une à quatre secondes à partir d'échantillons en fond noir observés entre lame et lamelle. Le pourcentage de cellules mobiles a été estimé par comptage des traces sur les tirages positifs agrandi 10 fois.

II.3.4. Analyse micro- cinématographique:

Des séquences cinématographiques à partir de film Kodak Plus X 50 ASA ont été effectuées en contraste interférentiel avec un objectif de x 25 à une vitesse de prise de vues de 50 ou 64 images par seconde sur un aliquote de 20 pl d'échantillon, placé entre lame et lamelle (20 x 20 mm) à 34 °C. Trois à six champs choisis au hasard ont été filmés pendant environ quatre secondes de façon à obtenir au minimum cinquante sptz par échantillon. Pour l'analyse, le film a été projeté image après image sur une table avec un grossissement final de 1 500. Les pourcentages de sptz mobiles, progressifs (quels que soient les déplacements et les formes de progression) et rotatifs ont été évalués sur l'ensemble des échantillons. Des dessins des positions successives des sptz correspondant à une seconde d'enregistrement (51 ou 65 images), ont permis de calculer les paramètres suivants :

- La vitesse de progression (V_p) (distance parcourue par la tête des spermatozoïdes dans l'axe de la direction de progression et exprimée en pm/sec).
- L'enveloppe des battements flagellaires (E) (largeur maximale de la surface balayée par le flagelle dans l'axe de progression).
- La fréquence de battement flagellaire (F_b) (nombre d'ondes flagellaires formé par seconde sur deux cycles consécutifs).
- La fréquence de rotation des gamètes (nombre de retournement de la tête du gamète par seconde).

II.3.5. Le système SQA (Sperm Quality Analyzer):

Cet appareil semi-automatique utilisant la densité optique permet de déterminer la concentration, la mobilité et le pourcentage de sptz ne présentant pas d'anomalies morphologiques. Ce système est facile à utiliser, il a une bonne répétabilité et son prix est plus abordable que le système CASA. Cependant, il est peu fiable pour les semences de mauvaise qualité et pour les semences très concentrées (Rijsselaere *et al.*, 2005).



Figure n° 12: Image du système SQA (Sperm Quality Analyzer).

II.3.6. Le système CASA (Computer Assisted Sperm Analysis):

a. Description du système d'analyse d'images automatisées:

Le système d'analyse automatisée CASA est actuellement en place dans plusieurs laboratoires de référence afin d'estimer objectivement les caractéristiques de mouvement des sptz. Il permet de visualiser et de numériser des images successives, de traiter et d'analyser les données et de fournir ensuite des informations exactes, précises et significatives sur la cinématique de cellules individuelles permettant d'apporter des données statistiques sur la population moyenne de cellules (Amann *et al.*, 2004).

Ces analyseurs automatiques de mobilité fournissent un très grand nombre de mesures objectives sur les caractéristiques de mobilité des sptz (Blanchard *et al.*, 2003 ; Holt *et al.*, 1997):

- le pourcentage de sptz mobiles (MOWT: Total Spermatozoa Motility).

- le pourcentage de mobilité progressive (PMOT: Progressive Spermatozoa Mobility).
- le pourcentage de sptz fléchant (dont la trajectoire a des caractéristiques supérieures à une vitesse et une linéarité de mouvement prédéfinie).
- l'amplitude de mouvements latéraux de la tête des sptz pendant leur déplacement (ALH : Amplitude of Latéral Heat Displacement).
- la vitesse moyenne de déplacement linéaire (VSL : Straight-Line Velocity).
- la vitesse curviligne (VCL : Curvilinear Velocity) c'est-à-dire la vitesse mesurée sur la distance totale parcourue.
- la fréquence des rythmes de croisements des trajectoires (BCF : Beat Cross Frequency).
- la moyenne de déplacements angulaires (MAD: Mean Angular Displacement).

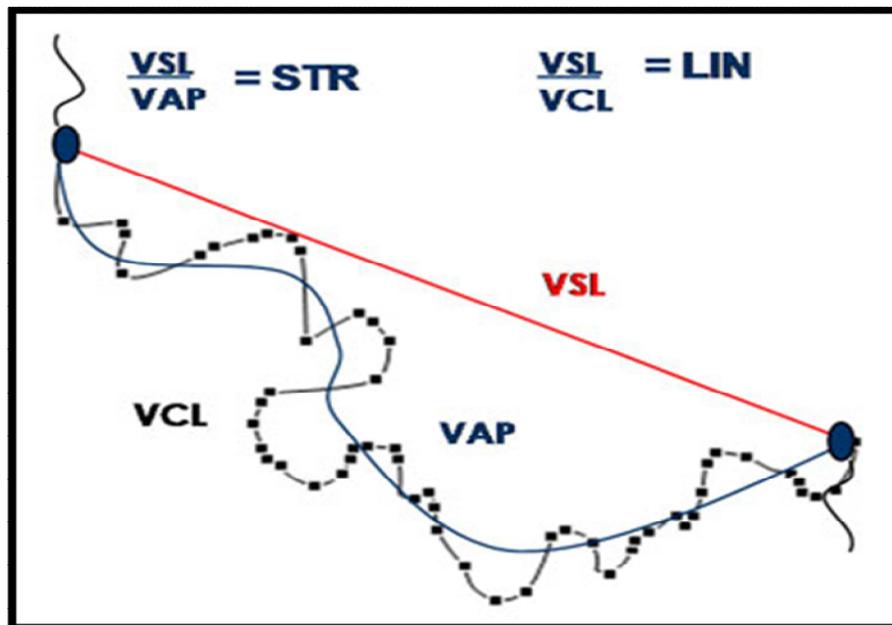


Figure n° 13: Représentation schématique des différentes vitesses mesurées par CASA.

b. Systèmes CASA actuels:

Aujourd'hui, les systèmes employés sont le système IVOS®, le système SM-CMA et le « Hobson Sperm Tracker ». Le système IVOS® a été développé en 1992 par Hamilton-Thorn. Il présente les innovations suivantes : un éclairage stroboscopique par illumination de diode pour produire des images nettes et plus précises, un système d'enregistrement pour favoriser le suivi de l'analyse du sperme, une classification automatisée des mouvements des sptz et l'utilisation facultative

d'une illumination fluorescente et d'un fluor chromé de l'ADN spermatique afin de distinguer les cellules de tout autre objet ambigu.

Le système SM-CMA a été développé dans le début des années 90. Il est le seul système à pouvoir détecter la pièce intermédiaire du sptz pour déterminer si l'objet immobile est bien un sptz intact ou pour distinguer la trajectoire propre à deux cellules qui se croisent ou se trouvent dans une région floue et incertaine. Le «Hobson Sperm Tracker » a été introduit dans le milieu des années 90 (Amann *et al.*, 2004).

L'analyse informatique des sptz est principalement réservée au monde de la recherche où la standardisation, l'exactitude et la précision sont des conditions indispensables à l'obtention de mesures expérimentales. L'intérêt de l'utilisation de l'analyseur CASA dans un environnement commercial, comme un hôpital vétérinaire ou un centre de reproduction, est sa capacité à recueillir des résultats objectifs sur la mobilité. Une incertitude existe cependant encore sur la relation entre la fertilité et les valeurs obtenues par le CASA.

Par ailleurs ces instruments permettent de sélectionner des caractéristiques diverses (fréquence et durée des prises d'images, valeur seuil démarquant la présence de mouvement, progression des mouvements, mesures de vitesse, taille et luminosité des têtes des sptz) afin d'optimiser la capture des sptz et de minimiser celle d'objets inertes. Chaque manipulation est importante pour améliorer la précision et la répétabilité des mesures données par les laboratoires (Jasko *et al.*, 1990 ; Wessel *et al.*, 2006).

Certains systèmes CASA sont équipés d'optiques fluorescentes, option nommée « Vident » permettant la détection de colorants comme celui de l'ADN SYBR-14. Il s'agit d'une méthode rapide, précise et objective d'évaluation de la viabilité et de la mobilité de la semence (Rijsselaere *et al.*, 2005). Des études ultérieures devront déterminer si la valeur prédictive de la mobilité spermatique peut être améliorée par cette méthode (Holt *et al.*, 1997).



Chapitre III

III.1. Définition:

Le sang frais dénommé aussi « sang total ». Le sang total est constitué d'un liquide biologique, le plasma, contenant toutes les cellules sanguines. Ces cellules ou « éléments figurés du sang » sont les globules rouges, les globules blancs et les plaquettes (Preynat-Seauve O et Kessler D, 2010).

Le sang des bovins est très rouge et relativement épais et collant. En cas d'anémie avancée, le sang devient très clair et limpide. Dans les maladies hémolytiques avec hémoglobinémie, il devient brun café et aqueux (Rosenberger, 1979).

III.2. Les différents composants sanguins:

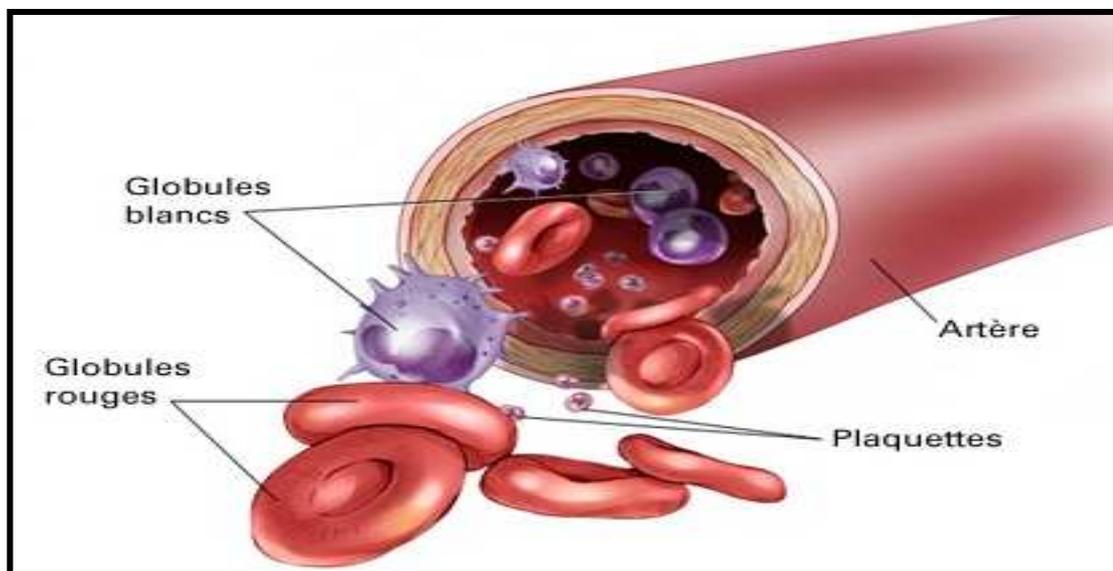


Figure n° 16: Les différentes compositions du sang
(<http://francois.derouin.free.fr/svtclggsand/?tag=sang>).

III.2.1. Les érythrocytes (ou hématies, ou globules rouges):

Elles ont une durée de vie relativement longue chez le bovin, d'environ 130 à 160 jours chez l'adulte et de 70 à 130 jours chez le veau (Cordonnier N et Fontaine J.J, 2001 ; Doxey D.L, 1977 ; Schalm O.W *et al.*, 2000).

III.2.2. Les plaquettes ou thrombocytes:

Chez le bovin adulte en bonne santé la numération plaquettaire est comprise entre 100 et 750. $10^3 / \text{mm}^3$ de sang et elles ont une durée de vie de 5 à 7 jours, puis elles sont détruites par les macrophages, ou consommées lors de l'hémostase (Cordonnier N et Fontaine J.J, 2001 ; Meyer K et Wardrop K.J, 1991).

III.2.3. Les globules blancs ou les leucocytes:

Les leucocytes ou globules blancs comprennent trois familles, aux rôles différents : les granulocytes, les monocytes, macrophages et les lymphocytes.

Tableau 4: Numération formule sanguine normale du bovin adulte (Drieu C, 2009).

Numération formule sanguine				
Formule érythrocytaire				
Paramètre	Valeurs normales		Moyenne	
Numération érythrocytaire (x 10 /mm)	5– 10		7	
Taux d'hémoglobine (g/100 ml)	8 – 15		11	
Hématocrite (%)	24 – 46		35	
VGM (μ)	40 – 60		52	
TGMH (pg)	11 – 17		14	
CCMH	30 – 36		32,7	
Numération réticulocytaire	0		0	
Diamètre érythrocytaire (μm)	4 – 8		5,8	
Formule leucocytaire				
Paramètres normaux (nombre mm)	Ecart normaux	Moyenne	Pourcentage de la population leucocytaire (%)	Pourcentage moyen
Numération leucocytaire	4000 – 12000	8000		
Neutrophiles non segmentés	0 – 120	20	0 – 2	0,5
Neutrophiles segmentés	600 – 4000	2000	15 – 45	28
Eosinophiles	0 – 2400	700	0 – 20	9
Basophiles	0 – 200	50	0 – 2	0,5
Monocytes	25 – 840	400	2 – 7	4
Lymphocytes	2500 – 7500	4500	45 – 75	58
Autres				
Numération thrombocytaire	100000 – 800000	500000		

III.3. Le plasma:

Le plasma est un fluide mis en mouvement par la pompe cardiaque. Il permet ainsi sur de longues distances le transport (transport convectif) et la fourniture aux cellules de molécules indispensables à la vie cellulaire (nutriments, molécules informatives...), ainsi que l'élimination rapide des déchets. Le transport par convection permet de s'affranchir des limites des lois de la diffusion (Ehrhart J.C).

Le plasma est une solution aqueuse de substances organiques et inorganiques. Ses constituants fonctionnels sont essentiellement des protéines (de transport, de défense, facteurs de coagulation, enzymes, etc).

On y trouve des éléments nutritifs (glucose, acides aminés, acides gras, ...), des produits de déchets du métabolisme cellulaire (urée, acide urique, bilirubine,...) des éléments minéraux (ions et oligo-éléments) et des hormones (Keskes L ; Ghorbel H, 2005).

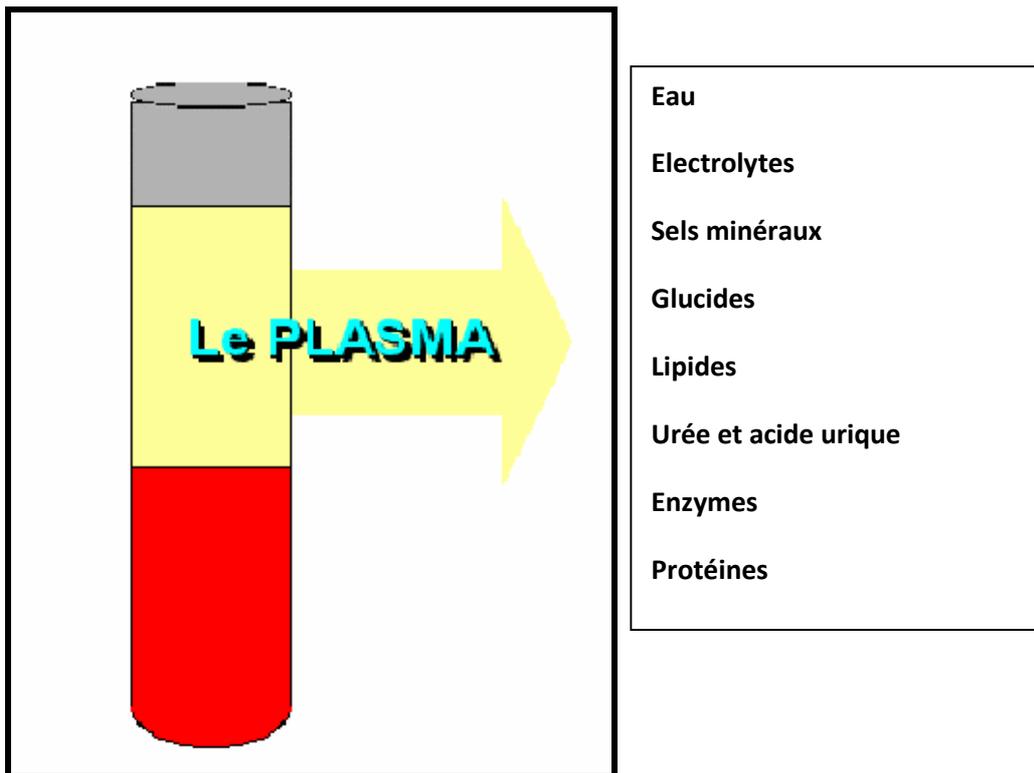


Figure n° 17: Composition du plasma sanguin (Keskes L et Ghorbel H, 2006).

III.4. Le sérum:

Le sérum est le liquide sanguin débarrassé de ses cellules et des protéines de la coagulation. C'est le liquide surnageant obtenu après la centrifugation du sang dans un tube « sec », c'est-à-dire sans inhibiteur de la coagulation. Ainsi, après

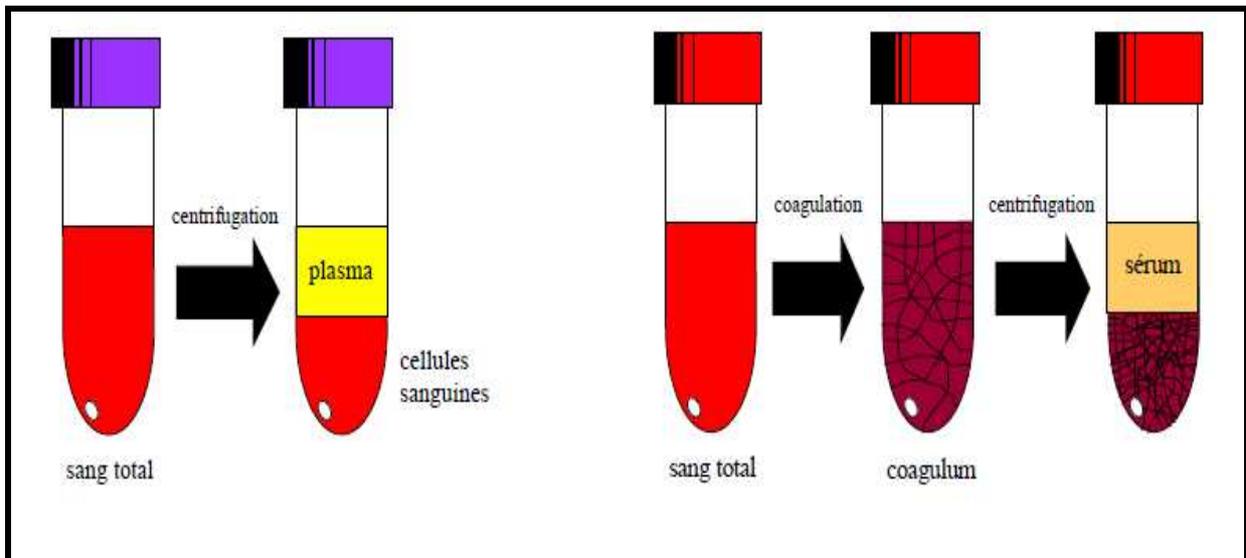
centrifugation le surnageant obtenu ne sera que du sérum puisque tout le fibrinogène sera consommé par la coagulation avec les hématies.

Il est important de comprendre que le sérum n'a pas la même composition que le plasma, puisque celle-ci a été modifiée par la coagulation. En effet :

→ Certains composés sont consommés durant la coagulation (exemples: glucose, fibrinogène). Leur concentration est donc abaissée dans le sérum par rapport au plasma.

→ Certains composés sont produits ou libérés dans le sérum durant la coagulation (exemples: potassium, lactate, phosphates). Leur concentration est donc augmentée dans le sérum par rapport au plasma.

→ Le plasma contient en plus un anticoagulant (Preynat-Seauve O et Kessler D, 2010).



Préparation du plasma

Préparation du sérum

Figure n° 18:Schéma représentant la différence entre le plasma et le sérum

(Preynat-Seauve O et Kessler D, 2010).

III.5. Le prélèvement sanguin:

Le matériel nécessaire au prélèvement sanguin est peu important, peu coûteux et aisément disponible. Le praticien peut utiliser une simple seringue sèche avec une aiguille. Dans ce cas il faut bien vérifier que la seringue et l'aiguille ne comportent aucune trace d'humidité, la présence d'eau provoquant une hémolyse et faussant ainsi les résultats des différents tests hématologiques (Larkin H.1984).

III.5.1. Sites de ponction et techniques:

a. Sites de ponction utilisables

Chez les bovins, les praticiens pourra utiliser la veine et l'artère coccygienne. La ponction de ces vaisseaux est aisée, mais on aura un mélange de sang artériel et veineux. Cependant ce mélange n'a que peu de répercussions sur les paramètres hématologiques par rapport à un prélèvement au niveau de la veine jugulaire (Parker B.N.J et Blowey R.W, 1974 ; Redetzky R *et al.*, 2002). Ce site de ponction est toutefois déconseillé si un test de la fonction hémostatique est envisagé, car le risque de contamination par des fluides tissulaires est élevée et fausserait les résultats des analyses (Schalm O.W *et al.*, 2000).

Comme il existe plusieurs sites de ponction facilement accessibles : le site préférentiel est la veine jugulaire de par son accessibilité et sa taille important. L'inconvénient de ce site de ponction est la nécessité d'une bonne contention (Schalm O.W *et al.*, 2000).

b. Techniques de ponction

Les techniques de ponction sont simples, au niveau de la veine jugulaire on exercera d'abord une compression avec une main proximale au site de ponction. Puis l'aiguille est insérée d'abord perpendiculairement à l'animal afin de percer la peau, puis inclinée selon un angle d'environ 30 degrés lors de la pénétration de la veine. Si une seringue est utilisée, le piston est alors tiré afin de créer une dépression et le sang recueilli jusqu'au volume souhaité (au moins 2 ml, en général 5ml). Si le système vacutainer est utilisé, l'aiguille est enfoncée dans le bouchon du tube jusqu'à le percer, et le sang est recueilli jusqu'au volume souhaité (Larkin H, 1984 ; Rosenberger G, 1979).

III.6. Différents types d'anticoagulants utilisés pour préparer le plasma :

a. EDTA : éthylènediamine-tétracétique acide

L'EDTA inactive le calcium nécessaire à la coagulation, ainsi d'autre ions comme le magnésium, en formant un complexe inactif. Il ne peut donc pas être utilisé pour doser le calcium, le magnésium et certains métaux lourds (plomb) (Preynat-Seauve O et Kessler D, 2010).

b. L'héparine

L'héparine pourrait être utilisée à raison de 100 mg par litre de sang. Néanmoins, elle semble posséder une action anticoagulante sur l'hôte malgré le facteur de dilution, ce qui empêcherait son utilisation systématique (Hunt et Moore, 1990 ; Savey, 1978). L'héparine ne possédant pas de propriétés conservatrices pour le sang, le prélèvement doit être utilisé immédiatement (Michell *et al.*, 1989 ; Morris, 1981).



Partie expérimentale

I. Matériel et méthodes

Notre travail consiste à étudier l'effet du plasma sanguin sur la mobilité des spermatozoïdes chez les bovins. Notre expérimentation a été réalisée dans le laboratoire de biologie animale au niveau de l'université Abderrahmane Mira de Bejaia.

I.1. Matériels

I.1.1. Matériels biologiques

I.1.1.1. Spermatozoïdes épидидymaire bovins :

Pour l'ensemble des expériences du travail présenté, les sptz épидидymaire ont été recueillis sur des testicules des taureaux prélevés après abattage de l'animal à l'abattoir communal de Bejaia puis transportés au laboratoire à une température ambiante. Le contenu de la région caudale du testicule est récupéré à l'aide de la méthode de rinçage rétrograde « retograde-flushing ».

I.1.1.2. plasma sanguin bovins :

Les échantillons de sang de notre étude proviennent de deux élevages de la wilaya de Bejaïa: le premier à Amizour et l'autre au village agricole de Timezrite. Ces prélèvements sanguins ont été réalisés sur des vaches a différentes phases du cycle physiologique, par le vétérinaire traitant à partir de la veine sous caudale, sur tubes hépariné et des tubes EDTA.



Figure n° 17 : Des tubes EDTA de sang complet de vaches.

I.1.2. produits chimiques

- Solution de chlorure de sodium NaCl 0.9%.
- charbon actif: dans notre travail on a utilisé la poudre de charbon actif DARCO S-51HFN à pH neutre, produit par le groupe Norit.

I.1.3. Matériel d'analyse :

- Centrifugeuse

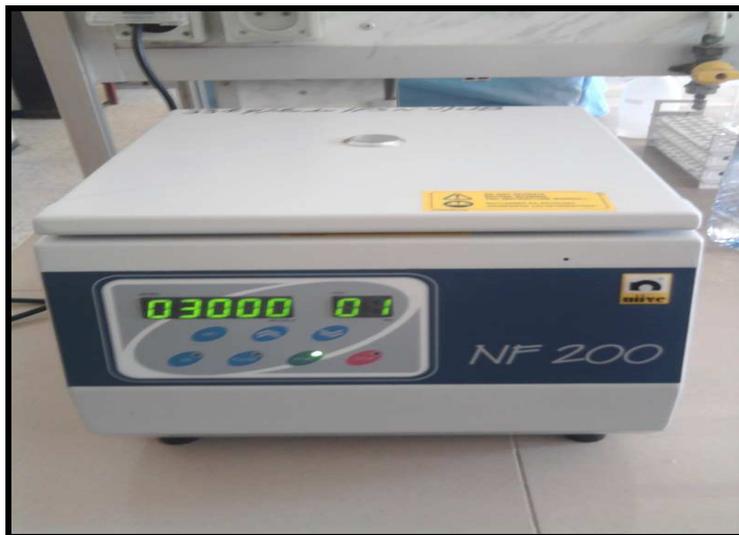


Figure n° 18 : Centrifugeuse de marque NF200.

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



Figure n° 19 : analyseur informatique de marque SCA

I.2. méthodes

I.2.1. Préparation des échantillons

I.2.1.1. préparation des échantillons de sperme

a. Obtention de spermatozoïdes épидидymaire

- Dissection de l'épididyme :

Le matériel qui est utilisé pour la dissection est un bistouri (lame tranchante), une pince et ciseaux.

La dissection de l'épididyme est réalisée comme suite :

- Les tissue qui enveloppent le testicule et l'épididyme ont été enlevé avec un bistouri

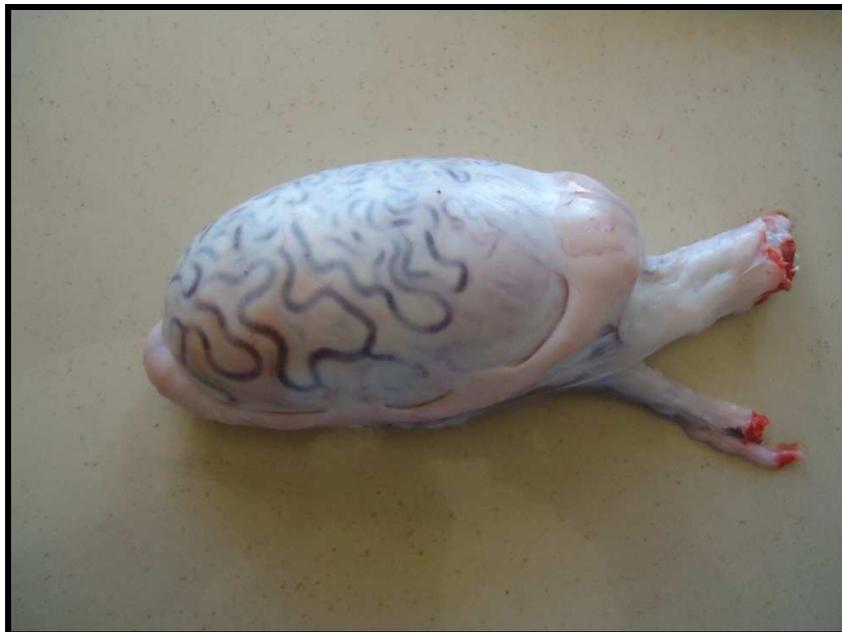


Figure n° 20 : Testicule après l'avoir dépourvu de la tunique vaginale.

- Puis on isole complètement l'épididyme et le canal déférent du testicule avec un bistouri et on le rince avec de l'eau et il est séché avec du papier absorbant.



Figure n° 21 : Epididyme juste après sa dissection et son isolation du testicule.

- Puis il est nettoyé des tissu en excès et du tissu conjonctif est isolé avec les vaisseaux sanguins pour éviter toute contamination de la semence avec le sang.

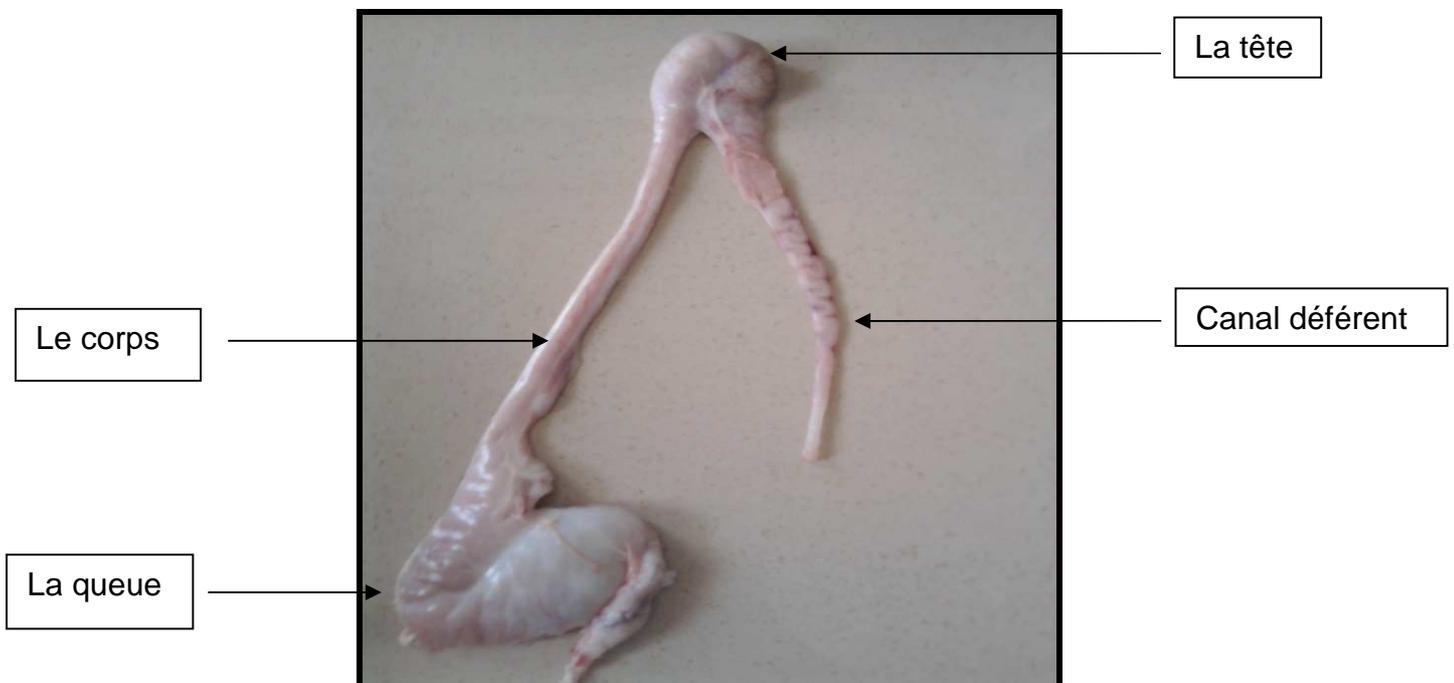


Figure n° 22 : L'épididyme après l'avoir dépourvu des tissus conjonctifs.

- **Récolte de la semence :**

La semence est récoltée avec la méthode rétrograde : l'aiguille d'une seringue rempli d'air est introduite dans la lumière du canal déférent, un clamp est placé juste à la fin de la queue et début du corps épидидymaire.

Une incision est réalisée au niveau de la queue de l'épididyme et un tube gradué (eppendorf) est placé juste en dessous afin de récolter la semence.

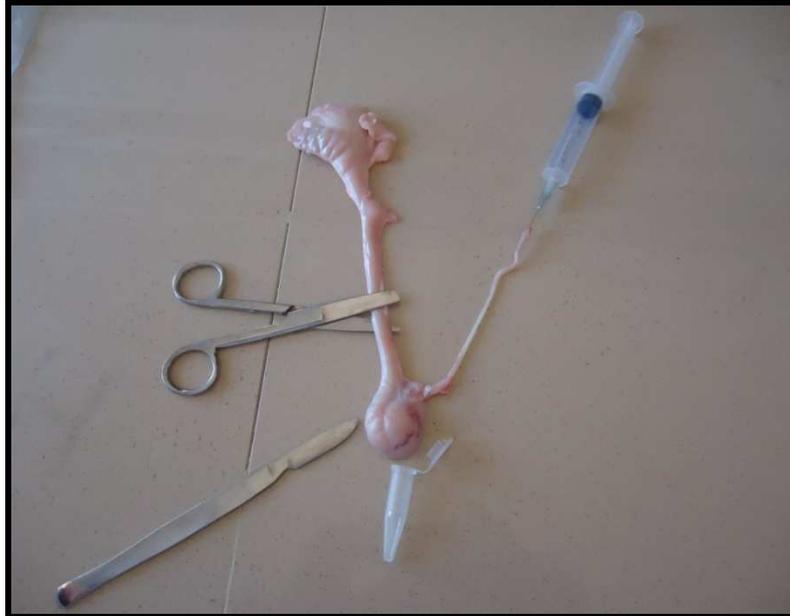


Figure n° 23 : Récolte de la semence par la méthode rétrograde.

- La semence est collectée dans un tube et elle est fin prête à être analysée.



Figure n° 24 : Semence épидидymaire collectée.

I.2.1.2. préparation des échantillons du sang :

Une fois au laboratoire, les échantillons du sang ont été centrifugés à 3000 rpm pendant 15 min et le plasma a été récupéré et a été conservé à - 4°C jusqu' au jour de son utilisation.

a. Préparation des témoins :

Le milieu de dilution utilisé est la solution physiologique (0,9% NaCl).

Le sperme a été dilué à 1/40^{ème} (soit 25 µl de semence fraîche dans 975 µl de la solution physiologique pour un volume total de 1 ml)

N.B : la solution physiologique (le milieu de dilution) constitue le premier témoin

a.1. Le plasma d'un male :

Le plasma male est dilué 1/9^{ème} dans la solution physiologique (0,9% de NaCl) avant son utilisation.

a.2. Un Plasma traité :

Il a été obtenu en mélangeant 1 ml de plasma d'une femelle gestante + 1ml de solution de charbon actif (1g de charbon actif et 70 ml de solution physiologique 0,9% de NaCl) (Iguer-ouada *et al.*, 2001)

- Après incubation de 20 min à 4°C et centrifugation à 3000 rpm pendant 20min.
- Le surnageant est récupéré et utilisé comme suit :
- Le plasma traité est dilué 1/9^{ème} dans une solution de NaCl 0,9% avant son emploi.

b. Préparation des traitements :

Les échantillons de plasma de 6 vaches de différents jours du cycle physiologique (0, 2, 5, 10, 12 et 18 jours) et le plasma de la vache gestante ont été dilués à 1/9^{ème} dans une solution de NaCl 0,9%.

Les échantillons ont été incubés à une température ambiante pendant toute la durée de l'expérience.

Tableau 5 : Résumé des différents témoins et traitements.

Milieus	codes
Solution physiologique	S.P
Plasma mâle 1	PM1
Plasma mâle 2	PM2
Plasma femelle traité	PFT
Plasma femelle à J0 (œstrus)	J0
Plasma femelle à J2 (méta-œstrus)	J2
Plasma femelle à J5 (di-œstrus)	J5
Plasma femelle à J10 (di-œstrus)	J10
Plasma femelle à J12 (di-œstrus)	J12
Plasma femelle à J18 (pro-œstrus ou gestante)	J18
Plasma femelle gestante	G

I.2.2. Co-incubation des différents échantillons de plasma avec le sperme :

Le sperme dilué est divisé dans des tubes à essai, est sera dilué 1/2^{ème} avec les échantillons de plasma à tester (soit 100 µl de sperme dilué dans 100 µl de l'échantillon).

Les mélanges ont été Incubés pendant 15min à température ambiante avant d'évaluer les différents paramètres de la mobilité spermatique.

I.2.3. Evaluation des paramètres de la mobilité spermatique :

Elle a été réalisée à l'aide d'un analyseur informatique de sperme SCA (sperm class Analyzer) à T0 (après 15 min de la co-incubation), à T1 (après 1 h), à T2 (après 2 h), à T3 (après 3 h), à T4 (après 4 h), à T5 (après 5 h) et à T6 (après 6 h) en suivant le protocole suivant :

Un volume de 10 µl de chaque mélange a été placé dans une chambre de Makler à température ambiante, puis observée sous microscope à contraste de phase relié au CASA avec un grossissement 10. Deux champs différents ont été analysés et des valeurs moyennes ont été calculées.

Pour chaque échantillon les paramètres suivant ont été calculés : le pourcentage de la mobilité (statiques, lents, moyens, rapides, progressifs moyens et progressifs rapides), la vitesse curvilinéaire en µm/s (VCL), la vitesse progressive en

$\mu\text{m/s}$ (VSL), la vitesse selon la trajectoire moyenne $\mu\text{m/s}$ (VAP) et l'amplitude de déplacement latéral de la tête (ALH).

Dans notre présente étude, on a analysé le % de spermatozoïdes mobiles et progressifs rapides et la VSL

I.3. Analyse statistique :

Les données calculées par l'analyseur informatique (SCA) ont été mises en forme grâce au logiciel Excel 2007.

L'évolution des paramètres étudiés en fonction du temps et l'effet des différents milieux (témoins et traitements) sur ses paramètres retenus ont été évalués en utilisant le logiciel statistique Statview 4.55 (Abacus concepts, inc., 1996).

A decorative horizontal scroll graphic with a black outline and rounded ends. The scroll is unrolled in the center, with the text 'Résultats et discussion' written inside in a black, italicized serif font. The top and bottom edges of the scroll have small circular details suggesting the binding or the edge of the paper.

Résultats et discussion

II. Résultats et discussions :

II.1. Résultats :

II.1.1. Effets des traitements :

a. Évolution du pourcentage des spermatozoïdes mobile dans les échantillons de Co-incubation avec les témoins :

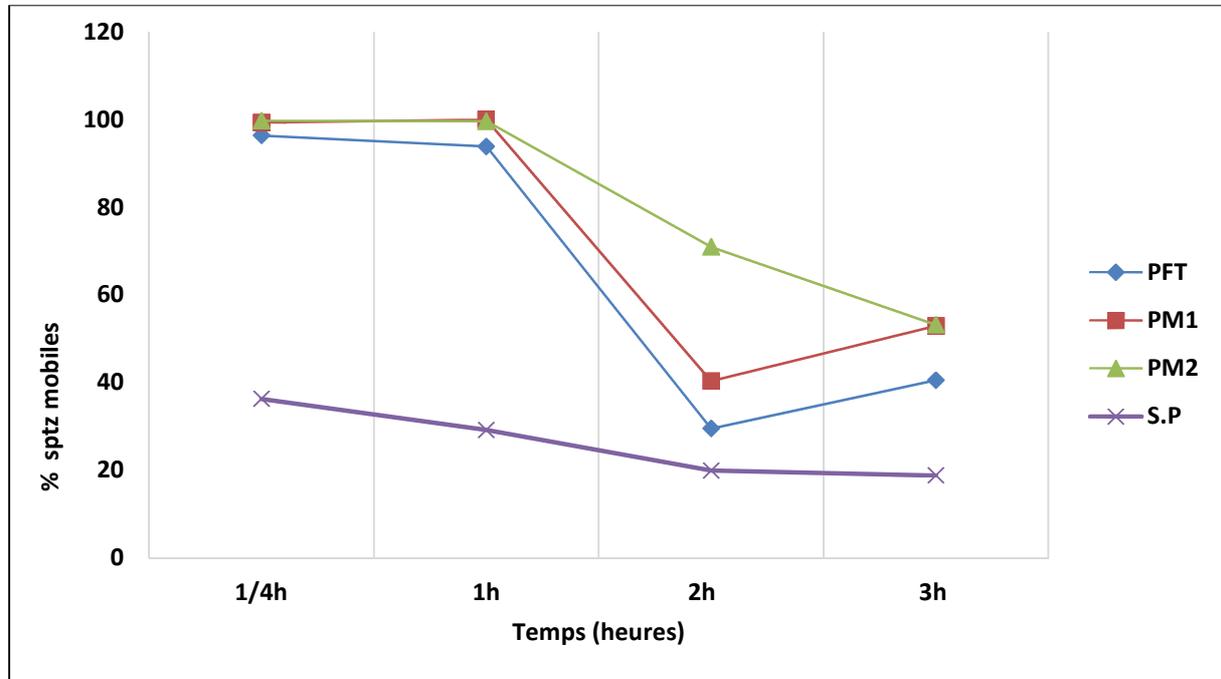


Figure n° 25 : Evolution du pourcentage des spermatozoïdes mobiles dans les échantillons témoins (plasma femelle traité (PFT), plasmas mâles (PM1, PM2) et solution physiologique (S.P) en fonction du temps.

(La figure n°33) montre que le pourcentage de spermatozoïdes mobiles dans les témoins contenant du plasma (plasma femelle traité (PFT), plasmas mâles (PM1 et PM2) est globalement supérieur par rapport au témoin contenant le milieu de dilution du sperme seul et cette supériorité est d'autant plus marquée à 15 minutes et à 1 heure après incubation.

En effet, le pourcentage de spermatozoïdes mobiles de 15 minutes à 1 heure d'incubation dans les témoins contenant du plasma frôlait la barre des 100% ($98,14 \pm 2,5$ %) alors qu'au niveau du témoin contenant le milieu de dilution seul, ce pourcentage n'a pas atteint les 40% à 15 minutes ($36,28\%$) d'incubation et a chuté à $29,17\%$ à 1 heure.

Après 2 heures d'incubation, la mobilité a diminué fortement pour deux des trois témoins (PFT et PM1) contenant du plasma en passant de la barre des 100% à celle des 40% (29,5 % et 40,32% respectivement).

Après 3 heures d'incubation, les % des spermatozoïdes dans les 2 milieux PFT et PM1 ont connu une légère augmentation parallèle pour atteindre respectivement 40,53% et 52,93% tandis que le milieu PM2, il a continué à diminuer pour atteindre 53,16%.

b. Évolution du pourcentage de la mobilité de sperme dans les échantillons de sperme complétés par le plasma femelle (traitements):

b.1. La mobilité en générale :

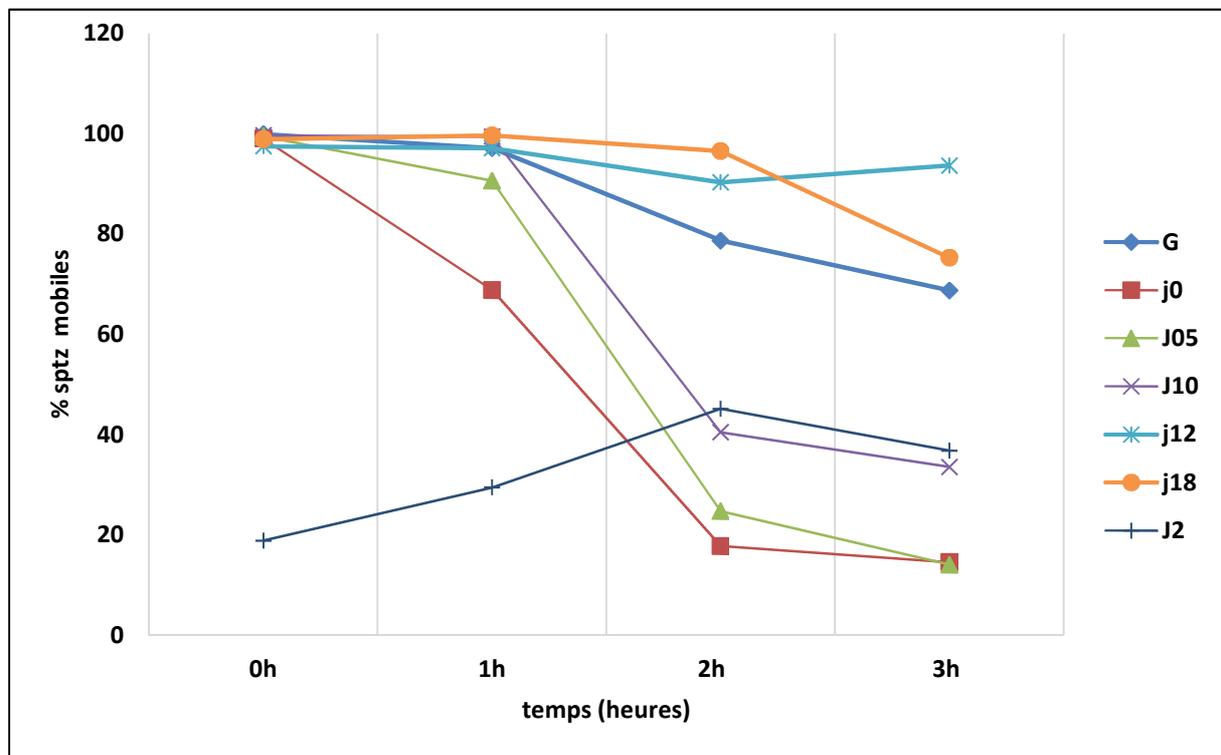


Figure n° 26 : Evolution du pourcentage des spermatozoïdes mobiles dans les échantillons contenant les plasmas de vaches de différents jours du cycle (traitements) en fonction du temps.

b.2. Comparaison par rapport au témoin « S.P » (solution physiologique) :

Après l'ajout du plasma femelle (traitements) on observe une augmentation des valeurs du pourcentage de la mobilité des spermatozoïdes en comparaison avec

letémoin contenant le milieu de dilution seul (S.P) à 15 minutes jusqu'à 1h de temps d'incubation, et cela pour le plasma des différents états physiologiques, sauf pour le plasma de la vache à 2 jours post-insémination (J2 ou met-œstrus) qui a connu une évolution semblable à celle du témoin contenant la solution physiologique.

Après 1 heure de temps les valeurs ont commencé à diminuer progressivement tout en restant toujours supérieure aux valeurs du milieu de dilution jusqu'à 3 heures.

Ainsi, **(figure n°34)** montre un effet apparent du plasma de différents états physiologiques sur le pourcentage des spermatozoïdes mobiles par rapport au milieu de dilution seul.

b.3. Comparaison par rapport aux témoins contenant le plasma femelle traité (PFT) et les plasmas mâles (PM1 et PM2) :

Globalement, de 15 minutes à 1 heure d'incubation, l'évolution du pourcentage de spermatozoïdes mobiles dans les plasmas de vaches à J5, à J10, à J12 et à J18 du cycle et celui de la vache gestante est identique à celle enregistrée dans les plasmas femelle traité (PFT) et mâles (PM1 et PM2) **(figures n° 33 et 34)**.

Cependant, la mobilité dans l'échantillon renfermant le plasma de la vache à J0 a enregistré une baisse remarquable à 1 heure par rapport à 15 minutes en passant de 99,05% à 68,84%.

La mobilité dans l'échantillon contenant le plasma de la vache en met-œstrus se distingue par sa valeur très faible à 15 minutes comparativement aux autres traitements et témoins contenant du plasma mais aussi par son évolution ascendante qui a continué jusqu'à 2 heures post-incubation en passant de 18,83% à 15 minutes à 29,45% à 1 heure et à 45,15% à 2 heures pour redescendre ensuite à 36,81% après 3 heures d'incubation.

De 1 heure à 2 heures d'incubation, la mobilité dans les échantillons de plasma de vaches à J0, à J5 et J10 a connu la même chute importante que pour les témoins renfermant du plasma **(figures n°33 et 34)** alors que le pourcentage de spermatozoïdes mobiles dans les plasmas des vaches gestante, à J12 et à J18 a été maintenu au-dessus de 78% à 2 heures d'incubation et au-dessus de 68% après 3 heures.

c. Evolution des pourcentages de spermatozoïdes progressifs rapides sous l'effet du plasma en fonction du temps :

c.1. Les témoins :

Comme il a été constaté pour la mobilité globale, les pourcentages de spermatozoïdes progressifs rapides dans les témoins contenant du plasma (plasma femelle traité (PFT), plasmas mâles (PM1 et PM2) dépassent ceux du témoin contenant le milieu de dilution seul (S.P) et cela a été notamment incontestable après 15 minutes et 1 heure d'incubation comme le montre clairement (**figure n°35**).

Alors que le pourcentage de spermatozoïdes progressifs rapides de 15 minutes à 1 heure d'incubation dans les témoins contenant du plasma se situait entre 20,1% et 32,63%, au niveau du milieu S.P, ce pourcentage n'a en aucun moment, dépassé les 1,12% enregistré à 15 minutes d'incubation.

Par ailleurs, après 2 heures d'incubation, le pourcentage de spermatozoïdes progressifs a diminué fortement pour les 3 témoins (PFT, PM1 et PM2) contenant du plasma en passant respectivement à 2,03%, 1,51% et 6,61% et cette tendance à la diminution à continuer après 3 heures d'incubation

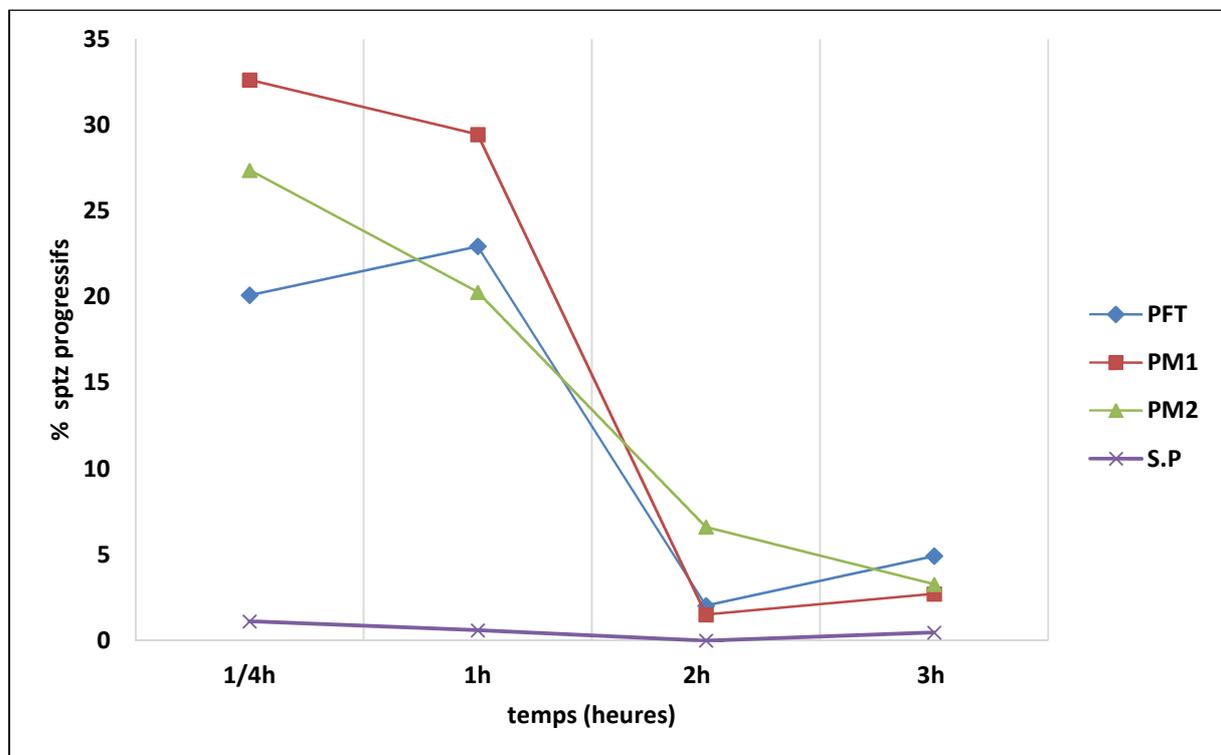


Figure n° 27 : Evolution du pourcentage des spermatozoïdes progressifs rapides dans les échantillons témoins (plasma femelle traité (PFT), plasmas mâles (PM1, PM2) et solution physiologique (S.P) en fonction du temps.

c.2. Les traitements :

- Comparaison par rapport au témoin « S.P » (solution physiologique) :

L'effet des plasmas des vaches sur le % de spermatozoïdes progressifs rapides par rapport au témoin S.P est illustré par la **(figure n° 36)**.

Cet effet est d'autant plus marqué de 15 minutes à 1 heure d'incubation pour tous les traitements.

Cependant, il est encore plus évident pour les plasmas des vaches : gestante, à J12 (di-œstrus) et à J18 (pro-œstrus ou gestante) dont l'effet reste marqué (malgré la tendance à la baisse) après 2 heures et même après 3 heures d'incubation pour ceux des vaches à J12 et à J18.

- Comparaison par rapport aux témoins contenant le plasma femelle traité (PFT) et les plasmas mâles (PM1 et PM2) :

Là aussi, globalement, de 15 minutes à 1 heure d'incubation, l'évolution du pourcentage de spermatozoïdes progressifs rapides dans les plasmas des vaches à J12, à J18 et gestante est similaire à celle enregistrée dans les témoins (PFT, PM1 et PM2) **(figures n°35et 36)**.

Alors que pour ceux des vaches à J0, à J5 et à J10, le pourcentage de spermatozoïdes hyper-motiles, de 15 minutes à une heure a connu une baisse remarquable et qui a continué après 2 et 3 heures pour atteindre des niveaux très bas et même nuls (0% à 2%), le pourcentage de ce type de spermatozoïdes a mieux persisté pour les plasmas des vaches (J12, J18 et gestante) après 2 heures d'incubation (6,61% à 15,21%) et même après 3 heures pour les plasmas des vaches à J12 et à J18 (8,1% et 10,76% respectivement).

Le pourcentage de spermatozoïdes progressifs rapides dans l'échantillon contenant le plasma de la vache en met-œstrus (J2) s'est distingué, encore une fois, par sa valeur très basse (0,11% à 0,32%) mais cette fois durant toute la période d'incubation comparativement aux autres traitements et témoins y compris le témoin S.P.

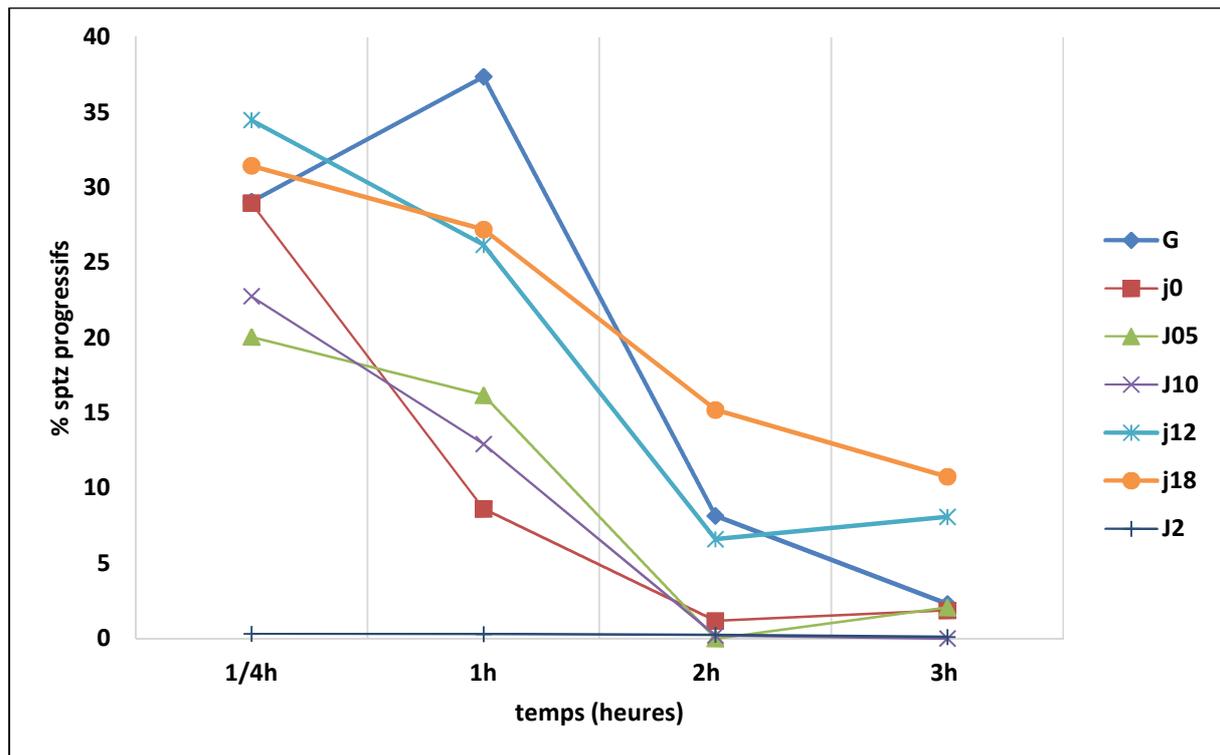


Figure n°28 : Effet du plasma des vaches à différents jours du cycle sur le pourcentage de spermatozoïdes progressifs rapides en fonction du temps.

d. Evolution des vitesses linéaires (VSL) des spermatozoïdes dans les échantillons de Co-incubation e fonction du temps :

d.1. Les témoins :

La vitesse de progression linéaire des spermatozoïdes (VSL) des témoins a connu une évolution semblable que les autres paramètres vus précédemment. En effet, comme pour les autres paramètres, la VSL des spermatozoïdes dans les témoins contenant du plasma (PFT, PM1 et PM2) ont été plus élevées ($p < 0,05$), durant toute la durée d'incubation, par rapport à celle des spermatozoïdes du témoin S.P (excepté à 3 heures pour le plasma PM2 où la différence entre les VSL moyennes des deux échantillons PM1 et SP n'était pas significative : $7,03 \pm 0,6$ vs $5,59 \pm 0,88$ $\mu\text{m/s}$).

Alors que la VSL des spermatozoïdes dans le témoin sans plasma (SP) n'ont pas dépassé en aucun moment la barre des 7 $\mu\text{m/sec}$ tandis que dans les témoins avec plasma (PFT, PM1 et PM2), elle a variée de $37,7 \pm 0,74$ (PM1 à 15 minutes) à $7,03 \pm 9,11$ $\mu\text{m/sec}$ (PM2 à 3 heures)

Par ailleurs, il est à noter que les spermatozoïdes dans le plasma de l'un des mâles (PM1) ont progressé plus rapidement ($p < 0,05$) que dans les plasmas : PFT et PM2 du départ (15 minutes) jusqu'à 2 heures.

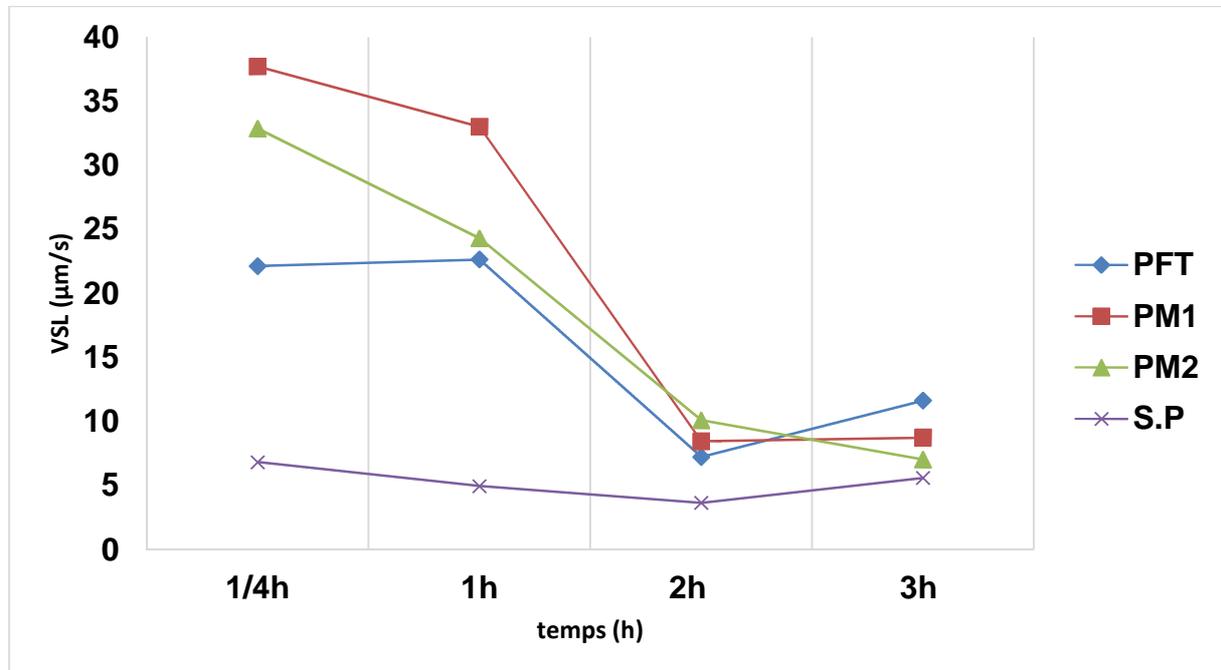


Figure n°29 : Evolution de la vitesse de progression linéaire (VSL) des spermatozoïdes dans les échantillons témoins (plasma femelle traité (PFT), plasmas mâles (PM1, PM2) et solution physiologique (S.P) en fonction du temps.

d.2. Les traitements :

- Comparaison par rapport au témoin « S.P » (solution physiologique) :

Tous les plasmas des vaches ont eu un effet significatif ($P < 0,05$) avéré sur la vitesse de progression des spermatozoïdes par rapport au témoin S.P à 15 minutes et à 1 heure d'incubation.

Néanmoins, cet effet est plus évident pour les plasmas des vaches : gestante, à J12 (di-œstrus) et à J18 (pro-œstrus ou gestante) dans cet intervalle de temps (15 mn -1 heure) mais aussi à 2 heures et à 3 heures malgré la tendance à la baisse avec l'avancement du temps.

Pour les plasmas des autres vaches (J0, J5 et J10), malgré l'effet prononcé par rapport au témoin sans plasma (SP) sur la VSL dans l'intervalle temporel (5 mn – 1 heure), cet effet s'estompe (pour J5 et J10) à 2 heures ($p > 0,05$) et à 3 heures (pour J0 et J10) ($p > 0,05$) et devient faible (pour J0 et J5) à 2 heures et à 3 heures respectivement.

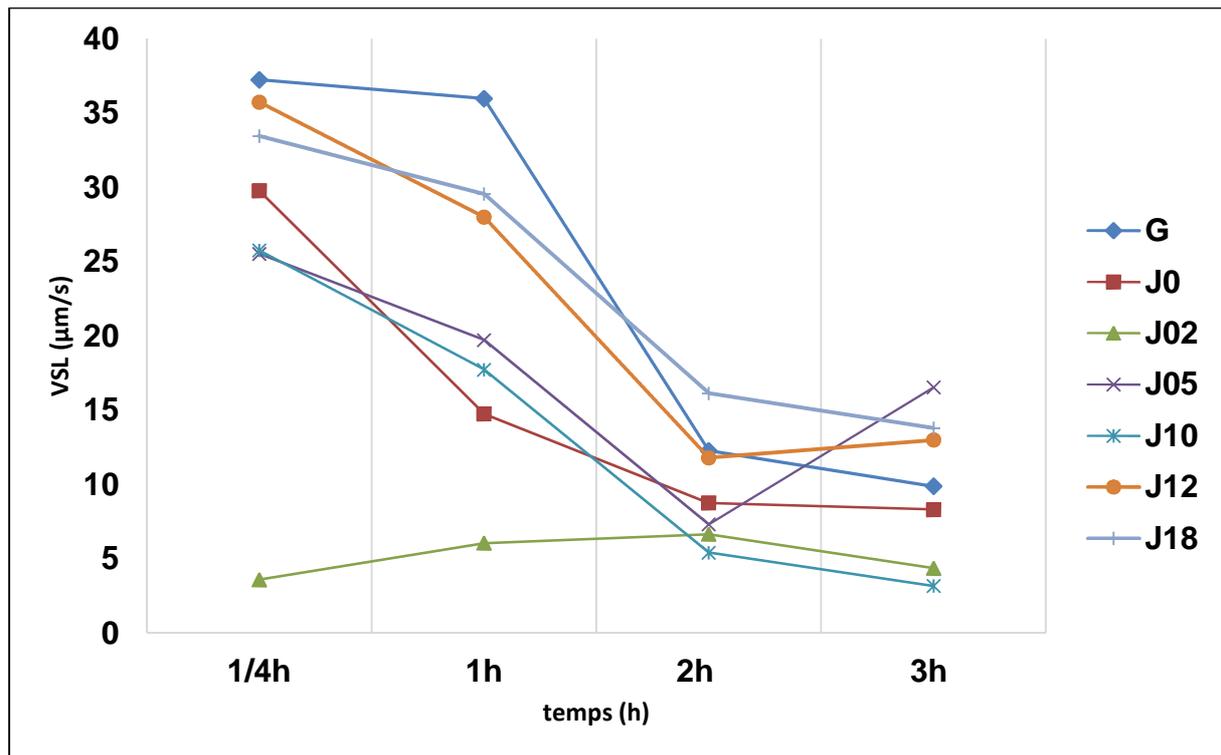


Figure n°30 : Effet du plasma des vaches à différents jours du cycle sur vitesse de progression linéaire (VSL) en fonction du temps.

- Comparaison par rapport aux témoins contenant le plasma femelle traité (PFT) et les plasmas mâles (PM1 et PM2) :

Les formes des courbes (**figures n° 37 et 38**) représentant l'évolution, en fonction du temps (de 15 minutes à 3 heures), des VSL des spermatozoïdes co-incubés avec les plasmas des vaches à J12, à J18 et gestante d'un côté et avec les plasmas témoins (PFT, PM1 et PM2) d'un autre, sont semblables mais les valeurs sont quasiment en faveur ($p < 0,05$) de ceux des plasmas de vaches (J12, J18 et G). Il faut tout de même signaler que les spermatozoïdes co-incubés avec le plasma mâle (PM1) ont progressé légèrement plus rapidement ($p < 0,05$) que ceux co-incubés avec le plasma de la vache à J18 à 15 minutes ($37,7 \pm 0,74$ vs $33,45 \pm 0,94$ $\mu\text{m}/\text{sec}$) et à 1 heure ($33 \pm 0,83$ vs $29,55 \pm 0,61$ $\mu\text{m}/\text{sec}$).

Ainsi, les traitements (J12, J18 et G) ont influencé plus la vitesse de progression (VSL) durant tout le temps d'incubation par rapport aux témoins avec plasma et évidemment par rapport au témoin sans plasma (S.P).

À l'opposé, les plasmas des vaches à J0, à J5 et à J10 ont ralenti la vitesse de progression des spermatozoïdes ($p < 0,05$) par rapport aux témoins avec plasma (PM1 et PM2) durant toute la durée d'incubation. Là aussi, il faut signaler qu'au début (à 15 minutes), les VSL des spermatozoïdes de ces 3 traitements ont été légèrement supérieures ($p < 0,05$) à celle du témoin PFT mais après, la tendance s'est inversée.

Comme ça été le cas pour les paramètres analysés précédemment, l'effet du plasma de la vache en met-œstrus (J2) est moindre ($p < 0,05$) par rapport à tous les traitements et témoins avec plasma durant toute la durée d'incubation (excepté à 2 heures où la VSL est identique ($p > 0,05$) à celle de la vache à J5).

L'effet du plasma de cette vache (J2) sur la VSL est identique à celui du témoin sans plasma à 15 minutes, à 1 heure et à 3 heures ($p > 0,05$). À 2 heures, il a eu un léger effet positif par rapport à ce témoin ($7,23 \pm 0,88$ vs $3,65 \pm 0,44$ $\mu\text{m}/\text{sec}$; $p < 0,05$)

II.2. Discussions :

Chez l'humain, l'effet stimulant du plasma de la femelle sur la motilité des spermatozoïdes a été rapporté (Liu *et al.*, 1986 ; De Lamirande *et al.*, 1991 ; Akerlof *et al.*, 1989). Et quelques auteurs ont recommandé cette supplémentation pour améliorer les taux de fertilité dans la procréation médicalement assistée (AMP) (Liu *et al.*, 1986). Et cet effet a été aussi démontré chez le chien (Iguer-Ouada et Verstegen, 2001).

La présente étude a pour but d'examiner l'effet possible du plasma de vaches à différents états physiologiques sur les paramètres de mobilité des spermatozoïdes. Afin de mesurer et comparer objectivement ces effets, on a eu recours à l'analyseur informatique SCA (sperm class Analyzer). Pour examiner un éventuel effet des hormones stéroïdiennes sur la mobilité du sperme, un plasma traité (PFT) par le charbon actif a été inclus dans les témoins examinés. Le milieu de dilution du sperme (la solution physiologique de NaCl à 0.9% nommée S.P) et le plasma de deux mâles (PM1 et PM2) ont été utilisés comme témoins.

Nos résultats suggèrent notamment que :

Les plasmas mâles (PM1 et PM2) et femelle traité par le charbon actif (PFT) ont eu un effet temporaire et de moindre importance par rapport à celui des plasmas de vaches (J12, J18 et gestante) au début (à 15 minutes et à 1 heure) sur les paramètres de la mobilité du sperme étudiés. Ensuite, cet effet s'est estompé à 2 et à 3 heures.

Par ailleurs, tous les traitements, excepté le plasma de la vache en œstrus (J2), ont eu plus d'effet par rapport au plasma femelle traité (PFT), notamment à partir d'une heure d'incubation, on peut relier cela, probablement, au fait qu'il est dépourvu de toute hormone stéroïdienne.

L'absence d'effet significatif des plasmas mâles (PM1 et PM2) après 1 heure serait due vraisemblablement au fait que la testostérone diminue le nombre de spermatozoïdes mobiles et viables en inhibant leur respiration tel qu'il a été rapporté par Trifunac *et al.* (1981).

Les plasmas de vaches (J12, J18 et gestante) ont eu un effet non seulement plus significatif que tous les témoins et les autres traitements mais en plus, il a persisté au-delà de 1 heure malgré sa tendance à baisser.

Cette stimulation de la mobilité peut être liée au phénomène de capacitation et elle peut être associée à l'induction de l'hyper activation des spz, car l'hyper activation est essentiel pour la fertilisation (Ramio *et al.*, 2008). Chez beaucoup d'espèces, l'hyper-activation est caractérisée par une plus grande vitesse de déplacement du sperme et de la tête avec augmentation de la BCF et ALH et cette observation été faite dans notre études.

Par ailleurs, l'effet révélé sur les paramètres de la mobilité pourrait être lié à la concentration en progestérones et au fait que le pourcentage des gamètes hyper mobiles s'accroît en parallèle avec cette hormone stéroïdienne d'autant plus que ces trois vaches (J12, J18 et gestante) sont en phase lutéale.

En effet, on a rapporté que des récepteurs spécifiques à la progestérone sont présents chez beaucoup d'espèces : l'homme (Sabeur *et al.*, 1996), le chien (Sirivaidyapong *et al.*, 1999) et le bovin (Dizier *et al.*, 2012).

Le mécanisme par lequel la progestérone exerce un tel effet semble être liée a la stimulation de l'influx de calcium comme il a été démontré par Blachmore *et al.*, (1991). Cet influx extracellulaire d'ions de calcium stimule la membrane adénine-cyclase ayant pour résultat une plus grande concentration intracellulaire de l'adénosine-mono-phosphate (AMP) ainsi que Ca⁺⁺, qui sont des régulateurs importants de la mobilité du sperme (Yeung *Cet al.*, 1999).

Par ailleurs, d'autres études (Iguerouada et Verstegen, 2001) chez le chien; ont signalé une amélioration de la mobilité des spermatozoïdes dans le plasma de femelle en œstrus. Dans notre étude, cet effet a été révélé uniquement, pour la

vache à J0 (en période d'œstrus), par rapport au témoin sans plasma (S.P) mais pas par rapport aux autres traitements et témoins. Cependant, dans le cas où la vache à J18 est en pro-œstrus (donc non gestante) c'est-à-dire en phase folliculaire et avec follicule pré-ovulatoire, cela confirmerait ces suggestions chez le Bovin.

Ces auteurs ont rapporté que la progestérone n'est pas le seul facteur impliqué dans la stimulation de la mobilité. Devkota *et al.*, (2008), de sa part, a indiqué qu'il y'a une corrélation positive entre la supplémentation d'œstradiol et le nombre de spermies mobiles.

Ainsi, les deux hormones stéroïdiennes (progestérone et œstradiol 17β) seraient probablement toutes les deux impliquées dans cet effet. Cette hypothèse est soutenue par l'observation que le pourcentage de spermatozoïdes hyper-motile le plus élevé a été observé dans les étapes œstrales correspondant à la période de fertilité optimale, quand le rapport de progestérone/œstradiol est le plus élevé (Iguer-Ouada *et al.*, 2001).

Ceci expliquerait le fait que, dans notre étude, les paramètres de la mobilité étudiés été très faibles et qu'il n'y avait aucune influence du plasma de la vache en met-œstrus (à J2) probablement à cause des taux faibles ou nuls de ces deux hormones stéroïdiennes au cours de cette période.



Conclusion

Conclusion et perspectives :

Afin de montrer l'effet du plasma de vaches a différents états physiologiques sur la mobilité spermatique en utilisant l'analyseur informatique SCA, nous avons utilisé comme témoins le milieu de dilution du sperme (la solution physiologique (S.P) de NaCl a 0.9%) pour révéler l'effet général et des plasmas de taureaux (PM1 et PM2) et le plasma femelle traité par le charbon actif (PFT) pour examiner un éventuel effet des hormones stéroïdiennes sur la mobilité du sperme.

Après les tests effectués, il s'est avéré que le plasma, en général, améliore et augmente la mobilité du sperme. Cependant, ceux des vaches (J12, J18 et gestante) se sont distingués en montrant non seulement un effet significatif plus que les autres traitements et témoins mais en plus cette influence a persisté au delà d'une heure. Alors que les plasmas mâles (PM1 et PM2) et femelle traité (PFT) ont eu un effet temporaire et de moindre importance par rapport à celui des plasmas de ces vaches au début (à 15 minutes et à 1 heure) sur les paramètres de la mobilité du sperme étudiés. Ensuite, cet effet s'est estompé à 2 et à 3 heures.

Par ailleurs, tous les autres traitements, excepté le plasma de la vache en met-œstrus (J2), ont eu plus d'effet par rapport au témoin sans plasma (S.P) et plus ou moins sur le témoin PFT.

Ceci est également vérifié pour les autres paramètres étudiés : le pourcentage des spermatozoïdes progressifs rapides et aussi les vitesses de progression linéaire des spermatozoïdes (VSL).

Cette stimulation de la mobilité a été, en grande partie, reliée à l'action, séparée ou conjointe, des deux hormones stéroïdiennes (progestérone et œstradiol) concernant particulièrement l'induction de l'hyper activation et de la capacitation des spermatozoïdes.

Au terme du présent travail, nous pouvons souligner l'effet bénéfique qu'apporte le plasma de vache en phase lutéale sur la mobilité et cela pourrait être utilisé comme supplémentation pour augmenter la mobilité des spermatozoïdes et donc améliorer la fertilité.



Référence bibliographique

Références bibliographiques

- **ALEXANDER P, (1995).** Blood transfusion. *In: Control and therapy of diseases of cattle.* Sidney, University of Sidney post graduate foundation in veterinary science, 31-32
- Cordonnier N et Fontaine JJ. Cours d'histologie générale. Hématologie. *Polycopié de l'unité d'anatomie pathologique de l'ENVA 2001, 73p.*
- **AMANN R.P, KATZ D.F, (2004).** *Reflections on CASA after 25 years.* Journal of Andrology; 25:317-25.
- **BARONE R, (1978).** «Anatomie comparée des mammifère domestiques ». Editions Vigot frères – Tome 3. LYON, 851p.
- **BARONE R, (1990).** « Anatomie comparée des mammifères domestiques ». Tome 4 :Splanchnologie _. Paris : Vigot., 501p.
- **BARONE R, (2001).** Anatomie comparée des mammifères domestique.4 Ed. Vigot, Paris.
- **BLACKMORE P.F, LATTANZIO F.A, (1991).** Cell surface localization of a novel non-genomic progesterone receptor on the head of human sperm. *Biochem Biophys Res Commun*;181:331-336.
- **BLANCHARD T.L et al., (2003).** *Manual of equine reproduction. 2nd edition.* Mosby.
- **BONNES G, DESCLAUDE J, et al., (2005).** « Reproduction des animaux d'élevage », Educagri édition, deuxième édition, 407 P.
- **BRESSOU C, (1978).** Anatomie régionale des animaux domestiques II : les ruminants.-Paris : J-B Ballière.
- **BRUYAS J.F, (1991).** Cycle œstral et détection des chaleurs. *Dépêche Vét.*, suppl. 19, 9-14.

- **CAROLE, ROSINECABANNES, (2008).** Comparaison des méthodes d'évaluation de la qualité de la semence dans les espèces bovine, canine et humaine. THESE : 03 – TOU 3 – 4108.
- **CARY J.A, MADILLS, FARNSWORTH K,HAYNA J.T, DUOOS L, et FAHNING M. L, (2004).** A comparison of electroejaculation and epididymal sperm collection techniques in stallions. The canadian veterinary Journal, 45(1),35.
- **CHARLES T, LEVASSEUR M.C, (2001).** « la à reproduction chez les mammifères et l'homme », 756-289 pp. Coédition INRA-Ellipses.
- **CHENG C.Y, ONEILL C, TINNEBERG H.R, BOETTCHER B, (1982).** Partial purification of components from fasting human blood plasma whichs timulate the forward migration of human spermatozoa. Experientia;338:480.
- **CHENOWETH P.J, (2007).** « Clinical Reproductive Anatomy and Physiology of the bull ». In : Robert, S, et al « Curent Therapy in large animal theriogenology », second edition, Saunders Elsevier, p 217.
- **ÇİFTCI H.B AND ZÜLKADIR U, (2010).** The effect of oestradiol-17 β on the motility, viability and the acrosomal status of bull sperm, Department of Animal Science, School of Agriculture, Selçuk University, 42079
- **CISSE D.T, (1991).** Follicullogenèse et endocrinologie chez la vache Gobra superovulée. Thèse : Méd. Vét. : Dakar ; 28.
- **COUROT M, (1970).** Spermatogenesis, Johnson. W-R et al: « The testis: Development, Anatomy, and Physiology » New York and London: AcademicPress, pp. 339-432.
- **CREVIER N, (1995).** Anatomie topographique de l'appareil génital de la vache appliquée à l'ovariectomie, In polycopié de l'ENVA, EPU de chirurgie bovine, Maisons-Alfort, 19-22.

- **DACHEUX F, DACHEUX J.L, (2001).** L'épididyme et les glands annexes. In Thibault, C., Levasseur, M-C. (ed), « la reproduction chez les mammifères et l'Homme », 290-315 pp. Coédition INRA-Ellipses.
- **DACHEUX J.L, DACHEUX F, et al., (1990),** « spermbiochemical changes during epididymal maturation ». In : « prospects for immunocontraception ». alexander N, griffin D, Spieler J.M, Waites G.M.H Eds, Wiley- Liss, Inc NY, 111- 128.
- **DADOUNE J.P, DEMOULIN A, (2001).** Structure et fonction du testicule. In Thibault, C., Levasseur, M.C. (ed), « la reproduction chez les mammifères et l'Homme », 756-289 pp. Coédition INRA-Ellipses.
- **Delamirande E, Gagnon C, (1991).** Quantitative assessment of the plasma-induced stimulation of human sperm motility. Int J Androl;14:11-22.
- **DERIVAUX J, (1971).** Reproduction chez les animaux domestiques tome II, le mâle : insémination artificielle.- Liège.-EditionDerouaux.-157.175pp.
- **DEUTSHIER G.H, WELLS M.E et BATTAGLIA R.A, (1974).** Evaluation of epididymal sperm by the cannulation technique and the effects of in vivo storage in angus bulls. Journal of animal science, 39(6), 1136-1143.
- **DEVKOTA B, KOSEKI T, MATSUI M, SASAKI M., KANKO E, MIYAMTO A, AMAYA MONTAYA C, AND MIYAKE Y.L, (2008).** Relationship amongage, body weight, scrotal circumference, semen quality and peripheral testosterone and estradiol concentrations in pubertal and post pubertal Holstein bulls. J. Vet. Med. Sci. 70, 119-121.
- **DJABAKOU K, FIMMEN H.O et BOTTGER M, (1984).** Examination of bull semenat CREAT.- Trypanotolerance and animal production, Avetonou (Togo): 40–44.
- **DOENECKE D et al., (1997).** « Histone gene expression and chromatin structure duri spermatogenesis ». AdvExp Med Bi01 424:37-48.

- **DOXEY D.L, (1977).** Hematology of the ox. In ARCHER R.K, JEFFCOTT L.B. and LEHMANN H. Comparative clinical hematology, 1st ed. Black well scientific publications : 216-169.
- **DRIEU C, (2009).** Hematologie en medecine bovine et application à la realisation d'une transfusion, 14 rues de verdun 92100 Boulogne-billancourt
- **DUMON T. P, (1997).** Appréciation de la fonction sexuelle du taureau reproducteur. *Le Point Vétérinaire*, **28**, 185, 19-32.
- **DYM M (1994).**« Spermatogonial stem cells of the testis ». Proc Natl AcadSci USA 91:11287-11289.
- **EUROPEAN SOCIETY FOR HUMAN REPRODUCTION AND EMBRYOLOGY, (1998).** Guidelines on the application of CASA technology in the analysis of spermatozoa. ESHRE Andrology Special Interest Group. Hum Reprod, 13(1):142-5.
- **EZEKWE A.G, (1988).**Ejaculate characteristics of two breeds of tropical bulls - N'dama and Muturu.- Joint seminar on animal reproduction for african countries.- Addis-Abeba:CIPEA
- **FIENI F, TAINTURIER D, BRUYAS J.F et BATTU I, (1995).** Physiologie de l'activité ovarienne cyclique chez la vache. Bull. Group. tech. vet, 4, 35-49.
- **GAURVEAU D, (2008).** Expression différentielle des prostaglandines et synthétases dans l'oviducte bovin au cours du cycle oestral, Université Lavale Quebec.
- **GAYRARDV, (2007).** Physiologie de la reproduction des mammifères, Ecole nationale vétérinaire, Toulouse.
- **GROOTEGOED J.A, et al., (1995).** « Molecular and cellular events in spermatogenesis », Hum Reprod 10 Suppl1:IO-14.
- **HAFEZ E.S.E. et BLANDAU R.J, (1969).** *The Mammalian Oviduct (Comparative biology and methodology)*: The University of Chicago Press.

- **HANZEN C, (2008).** La propédeutique de l'appareil reproducteur et l'examen du sperme des ruminants.
- **HOCHEREAU M.T ET al., (1964).** Durée de la spermatogénèse chez le taureau : étude par autoradiographie testiculaire. 5th. Int. Congr. Anim. Reprod. Artif. Insem.3:541.
- **HOLSTEIN A.F, DAVIDOFF M.S,(1997).** « organisation of the intertubular tissue of humain testis », In Mutta P-M coord, recentadvances, In microscopy of cells, tissues and organs,antoniodel finoeditore, rome, 569- 577. In Thibault. C, Levasseur. M-C. (ed), « la reproduction chez les mammifères et l'Homme », 290-315 pp, Coédition INRA-Ellipses.
- **HOLT C, HOLT W.V, MOORE H.D.M, REED H.C.B, CURNOCK R.M, (1997).***Objective lymea sured boar sperm motility parameter scorrelate with the outcomes of on-farm inseminations: results of two fertility trials.* Journal of Andrology;18:312-23.
- <http://francois.derouin.free.fr/svtclggsand/?tag=sang>.
- **IGUER-OUADA M AND VERSTEGEN J.P, (2001).** Oestrous Cycle Stage Dependent Effects of Plasma and Vaginal Fluid on Dog Semen Motility Parameters. Reproduction Section, *Department of Small Animal Clinical Sciences, College of Veterinary Medicine, University of Liege, Bd Colonster 20, B44, 4000 Liege Belgium* p197-217.
- **JAIN N.C, ESSENTIALS OF VETERINARY HEMATOLOGY, (1993).** 1st edition. Black well scientific publications, 417p.
- **JASKO D.J, LEIN D.H, FOOTE R.H, (1990).** *A comparaisn of two computer-automated semen analysis instruments for the evaluation of sperm motion characteristics in the stallion.* Journal of Andrology, 11:453-9.

- **KAABI M, PAZ P, ALVAREZ M, ANEL E, BOIXO J.C, ROUISSI H et ANEL L, (2003).** Effect of epididymis handling conditions on the quality of ram spermatozoa recovered post-mortem. *Theriogenologie* ,60(7) ,1249-1259.
- **KESKES L et GHORBEL H, (2006).** Le tissu sanguin, université de SFAX.
- **KOHLER S, (2004).** Anatomie et physiologie de l'appareil reproducteur femelle, Haute école spécialisée Bernoise.Konya, Turkey
- **LARKIN H,** Laboratory practice. 3. Procuring and handling blood. *Ir. Vet. Jour.* 1984 ; 38 : 159-161.
- **MARIEB E.N, LAURENDEAU G, (1993).** Le système génital. Dans Édition du Renouveau Pédagogique, « Anatomie et Physiologie Humaine » St-Laurent(Qc), pp. 932-973.
- **MARTINEZ-PASTEUR F,GARCIA MACIAS V, ALVAREZ M, CHAMORRO C,HERRAEZ P, PAZ P.D et ANEL L, (2006).** comparison of two methods for obtaining spermatozoa from the cauda epididymis of iberian reddeer. *Theriogenologie*, 65(3),471-485.
- **MATSUMOTO A.M, (1996).** Spermatogenesis. Dans E.Y. Adashi, J.A. Rock and Rosenwaks (eds), « Reproductive Endocrinology, Surgery, and Technology » Philadelphia: Lippincott-RavenPublishers, pp. 359-384.
- **MCGAVIN M.D, SMITH J.E, (1973).** Makingsmears of capillary blood from the bovine tail. *Veterinary medicine*; 68(7) : 778-781.
- **MEYER K et WARDROP K.J, (1991).** Platelets and coagulation. *Adv. Vet. Sci. Comp. Med.* 36 : 89-115.
- **MICHELAT J, CHAUVIER G, (1974).** Encyclopédie Vétérinaire. *Editions Vigot Frères- Tome2. PARIS, 76.*
- **MICHELL A.R, BYWATER R.J, CLARKE K W, HALL L.W, WATERMAN A.E, (1989).** Blood transfusion In: *Veterinary fluid therapy.* 1st ed., Oxford, Black well Scientific Publications LTD, 149-165.

- **MORROW D, (1986).** Current therapy in theriogenology. Diagnosis, treatment and prevention of reproductive diseases in small and large animals. Philadelphia: W.B. Saunders Company, Volume 2, 1143 p.
- **MORTIMER S.T, (2000).** CASA: practical aspects. J Androl 2000;21(4):515-24.
- **NICOLAS B, (2007).** Intérêts de l'ovariectomie pour l'engraissement de vache de race charolaise, thèse N°63, P 21, Lyon.
- **NISHIMWE K, (2008).** Evaluation des facteurs de variation du taux de réussite de l'insémination artificielle bovine en milieu traditionnel au Sénégal : cas de la région de Thiès, U. Cheikh Anta Diop de Dakar.
- **PAREZ V et DUPLAN J. M. (1987).** L'insémination artificielle bovine. Paris : ITEB/UNCEIA.- 256p.
- **PARKER B.N.J ET BLOWEY R.W,(1974).** A comparison of blood from the jugular vein and coccygeal artery and vein of cows. Vet. Rec. 95 : 14-18.
- **PREYNAT-SEAUVE O ET KESSELER D, CSCQ, (2010).** Fiche Technique : 29 Sérum ou Plasma.
- **RADOSTIS O.M, GAY C.C, BLOOD D.C, HINCHCLIFF K.W, (2000).** Veterinary medicine. 9th ed., Londres, W.B. Saunders Company Ltd, 1877p.
- **RAMIO L´, RIVERA M.M, RAMI´REZ A, CONCHA I.I, PENAA B.A, RIGUAU T, RODRI´GUEZ-GIL E.J, (2008).** Dynamics of motile-sperm sub-population structure in boar ejaculates subjected to "in vitro" capacitation and further "in vitro" acrosome reaction. Theriogenology 69 501–512.
- **REDEZKY R, KROMKER V, HAMANN J, (2002).** Comparison of blood constituent concentrations from the udder and jugular vein of high yield dairy cows. Proceedings of the XXII World Veterinary Congress, Hannover.
- **RIJSSELAERE T, VAN SOOM A, TANGHE S, CORYN M, MAES D, DEKRUIF A. (2005).** New techniques for the assessment of canine semen quality : a review. Theriogenology, 64, 706-709.

- **ROBAIRE B, HERMO L, (1988)**, « efferent ducts, epididymis and vas deferens : structure, functions and their regulation ». In : the physiology of reproduction, Knobil E, et al, Raven Press Ltd, NY, 999- 1080.
- **ROSENBERGER G,(1979)**. Examen clinique des bovins, 1^{ère} édition française, Les éditions du point vétérinaire, 526 pages.
- **SABEUR K, EDWARDS D.P, MEIZEL S, (1996)**. Human sperm plasma membrane progesterone receptor(s) and the acrosome reaction. Biol Reprod;54:993-1001.
- **SALISBURY G.W. et VANDEMARK N.L, (1961)**. Physiology of reproduction and artificial insemination of cattle.- San Francisco : Freeman & co.-639p.
- **SAVEY M, (1983)**. Mammittes et avortements : un aspect trop souvent ignoré des leptospiroses bovines. Le point vétérinaire ; 15 (71) : 54.
- **SCHALM O.W, FELDMAN B.F, ZINKL J.G, JAIN N.C, (2000)**. Schalm's veterinary hematology. 5th ed. Blackwell scientific editions, 1344p.
- **SETCHELL B.P, (1991)**. Male Reproductive Organs and semen. In : CUPPS, P-T. Reproduction in : Domestic Animals, 4^{ème} édition. San Diego: Academic Press, 221-249.
- **SIRIVAIYAPONG S, BEVERS M.M, COLENBRANDER B, (1999)**. Acrosome reaction in dog sperm is induced by a membrane-localized progesterone receptor. J Androl;20:537-544.
- P.G. Red blood cells of domestic mammals. 1st ed., Amsterdam, Elsevier, 357-366.
- **STEVENSON J.S. (2007)**. Clinical Reproductive Physiology of the Cow In: young quistr.s and threlfallw.r (eds). Current Therapy in Large Animal Theriogenology, Elsevier Saunders. St Louis, 258-270. The metabolism of human spermatozoa. Contraception 23: 527-533.

- **THIBIER M, (1976).** Le Cycle sexuel de mammifères domestiques. - *Economie et Médecine Animales.*
- **TIBARY A, BAKKOWY M, (2005).** *Reproduction equine. Tome II: l'étalon.*
- **TRAORE P, (1996).** Les méthodes d'évaluation du sperme du taureau destiné à l'insémination artificielle. Thèse : Méd. Vét. : Rabat (IAV Hassan II).
- **TRIFUNAC N.P AND BERNSTEIN, (1981).** G.S. Effect of steroid hormones.
- **TURRI F.E.D.E.R.I.C.A, MAEDDU M, GLIOZZI T.M, GANDINI G et PIZZI F, (2012).** Influence of recovery methods and extenders on bull epididymal spermatozoa quality. *Reproduction in domestic animals*, 47(5) ,712-717.
- **VAISSAIRE J.P, (1977).** Sexualité et reproduction des mammifères domestiques de laboratoire. - Paris : Edition maloine.
- **WESSEL M.T, ALTHOUSE G.C, (2006).** *Validation of an objective approach for simulat neous assessment of viability and motility of fresh and coole dequine spermatozoa.* *Animal Reproduction Science*; 94:21-2.
- **YEUNG C, WEINBAUER G.F, COOPER T.G, (1999).** Responses of monkey epididymal sperm of different maturation alstatus to second messengers mediating protein tyrosine phosphorylation, acrosome reaction, and motility. *Mol Reprod Dev*;54:194-202.

Résumé

L'objectif du présent travail est d'étudier l'effet du plasma de vaches de différents états physiologiques sur la mobilité spermatique.

Le plasma est obtenu après centrifugation de sang prélevé de vaches à différents jours du cycle oestral. Le sperme utilisé est collecté de l'épididyme de testicules de taureaux récupérés de l'abattoir local. Le sperme et les plasmas ont été co-incubés et les paramètres de la mobilité ont été mesurés par l'analyseur SCA (Sperm Class Analyzer) et comparés aux quatre témoins. Les résultats ont montré que le plasma améliore et augmente les valeurs des paramètres de la mobilité du sperme, particulièrement ceux des vaches (J12, J18 et gestante) qui ont non seulement un effet significatif plus que les autres traitements mais en plus il a persisté. Par ailleurs, tous les autres traitements, excepté le plasma de la vache en met-œstrus (J2), ont eu un effet par rapport aux témoins PS et PFT. Cette stimulation de la mobilité a été reliée principalement à l'action des hormones stéroïdiennes (progestérone et œstradiol).

Mot clés : plasma, spermatozoïde, mobilité, bovin

Abstract

The aim of this study was to investigate the effect of plasma of cows in different physiological states on sperm motility.

Plasma is obtained after centrifugation of blood collected from cows at various days of the estrous cycle. The semen used was collected from the epididymis of bulls' testicles recovered from the local slaughterhouse. Semen and plasma were co-incubated and mobility parameters were measured by the sperm class analyzer and compared with controls. The results showed that the plasma improves and increases the values of parameters of sperm motility especially cows (in d12, in d18 and pregnant) which not only have a more meaningful effect than the other treatments but it also persisted. Furthermore, all other treatments, except the cow plasma in met-estrus (in d2), had an effect compared with PS and PFT controls.

Keywords : plasma, spermatozoa, motility, bovine