

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Saad Dahlab blida 1
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de biologie des populations organiques
Option: biologie et physiologie de la reproduction



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

Thème

Caractérisation de la semence bovine
(paillettes) par méthode CASA et cytométrie en
flux

Présenté par :

TAHRI Salma

DJOUABI Samiha

Soutenu publiquement le 15/09/2018 devant le jury compose de:

Presidente :	M ^{me} Benazouz F.	Maitre de conférence A	USDB
Examinatrice:	M ^{me} Benmansour N.	Maitre de conference B	USDB
Promoteur :	M ^f Bessaad M.A.	Maitre de conference B	USDB
Co-promoteur :	M ^f . Kaidi R.	Professeur	ISVB

Promotion 2017/2018

Remerciements

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

*Nos remerciements les plus sincères à **M. BENAZOUZ F**, d'avoir accepté de présider le jury.*

*Nous remercions, également **M. BENMANSOUR N**, d'avoir accepté d'examiner notre travail.*

*Nous tenons à exprimer nos sincères considérations et remerciements à notre promoteur **Mr. BESSAAD M.A**, pour ses précieux conseils, son aide, son orientation, sa gentillesse et sa générosité. Qu'il veuille bien agréer notre profonde et éternelle gratitude.*

*Nous tenons à présenter nos remerciements à notre co- promoteur **M. KAIDI Rachid** pour avoir accepté d'encadrer et de diriger ce travail avec rigueur scientifique et pragmatisme.*

*Nous remercions vivement **M. BOUGHANEM Amel**, la responsable du laboratoire du CNIAAG, de nous avoir chaleureusement accueilli au sein de leurs laboratoires et pour leurs aides maintes fois renouvelées.*

*Nous tenons également à remercier **M. KOURAT Ahcene**, du laboratoire de production de semences bovines du CNIAAG, de nous avoir aidés et orientés tout au long de notre période de stage. Vos qualités humaines nous ont beaucoup marqués. Veuillez trouver ici notre sincère reconnaissance.*

*Nous tenons à remercier tout particulièrement **M. TARZAALI D**, pour ses orientations et ses aides qu'elle nous a accordés.*

*Nous tenons à présenter nos remerciements à **M. BRAHIM ERRAHMANI** pour ses aides et sa rigueur scientifique, veuillez trouver ici, monsieur, l'expression de notre profonde gratitude.*

*Nous tenons à remercier également toute l'équipe du laboratoire du CNIAAG et toute l'équipe du laboratoire **LBRA**, qui ont veillé au bon déroulement de notre stage.*

Dédicace

*Je dédie ce travail :
à mes très chers parents qui m'ont fourni au quotidien un soutien et
une confiance sans faille et de ce fait, je ne saurais exprimer ma
gratitude seulement par des mots. Que dieu vous protège et vous
garde pour nous.*

*à ma sœur feriel et mes frères.
Que dieu vous protège*

à mon mari ISLAM

à ma chère binôme SAMIHA et sa famille

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

SALMA.

Dédicace

Je dédie ce travail :

à mes très chers parents qui m'ont fourni au quotidien un soutien et une confiance sans faille et de ce fait, je ne saurais exprimer ma gratitude seulement par des mots. Que dieu vous protège et vous garde pour nous.

à notre ange gardien « Rania ».

à ma sœur Lamia et mon frère Hichem.

Que dieu vous protège.

à ma tante « mima » la source de tendresse et l'exemple de dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager.

à ma chère binôme SALMA et sa famille.

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

SAMIHA.

Résumé

Le succès de l'insémination artificielle chez les bovins dépend la qualité de la semence, et pour garantir une semence de bonne qualité dans laquelle les spermatozoïdes sont en bon état de vitalité et en nombre suffisant tout en maintenir leur pouvoir fécondant, il existe des tests et des analyses de l'échantillon par différentes techniques.

Dans cette étude nous avons proposé d'étudier quelques paramètres permettant l'évaluation de la qualité des semences bovines de 14 taureaux, en utilisant deux méthodes différentes : CASA et cytométrie en flux. la concentration, la viabilité, la motilité, et la morphologie ont été évalués par la méthode CASA, et la concentration, la viabilité, et l'oxydation ont été évalués par la méthode cytométrie en flux. ensuite nous avons comparé entre les résultats de la concentration obtenues par CASA et les résultats de la concentration obtenues par cytométrie en flux, et également pour les résultats de la viabilité. Nous avons comparé aussi la morphologie des spermatozoïdes avec l'oxydation et extraire le lien entre les deux.

Il ressort de cette étude que le processus congélation/décongélation des semences affecte sur la motilité et la viabilité des spermatozoïdes significativement et donc diminuer la qualité des semences.

Mots clé : semence bovine, spermatozoides, congélation-décongélation, CASA, cytométrie en flux.

TABLES DES MATIERES

Liste des figures	
Liste des tableaux	
Liste des abréviations	
Introduction	1
Chapitre 1 : Revue bibliographe	
I. Rappel anatomo-physiologique de l'appareil reproducteur du taureau.....	3
I.1. Physiologies de l'appareil reproducteur du taureau	3
I.2. les étapes de la fécondation.....	5
II. Technologie de la semence bovine.....	6
II.1. méthodes de récolte du sperme.....	6
II.2. préparation et conservation de la semence.....	7
II.3. analyse de la qualité du sperme récolté.....	7
II.3.1. examen macroscopique.....	7
II.3.2. Examen microscopique.....	9
II.4. Techniques d'analyse de la semence.....	12
II.4.1. CASA.....	12
II.4.2. Cytométrie en flux.....	12
II.5. Cryoconservation de la semence.....	13
II.6. les tests de fertilité.....	13
II.7. Insémination artificiel	14
Chapitre 2 : Matériel et méthodes	
I.1. Matériel biologiques.....	16
I.2. Matériel de laboratoire	16
II. Méthodes	19
II.1. Par CASA.....	19
II.1.1. Motilité.....	19
II.1.2. Viabilité.....	19
II.1.3. Morphologie	19
II.1.4. Etude statistique.....	19

II.2. Par cytométrie en flux.....	20
II.2.1. Concentration et viabilité.....	20
II.2.2. Statut d'oxydation.....	20

Chapitre 3: Résultats et discussion

I. Résultats par CASA.....	21
II. Résultats par cytométrie en flux.....	24
III. Comparaison de la concentration obtenue par les deux techniques.....	32
IV. Comparaison de la viabilité obtenue par les deux techniques.....	34
V. Comparaison entre la morphologie et le statut oxydatif.....	35

Conclusion et Perspectives

Références bibliographique

Liste des tableaux

Tableau I : Paramètres séminologiques du taureau (d'après Cupps, 1991).

Tableau II : Notation de la motilité massale du sperme dans l'espèce bovine (Rukundo,2009).

Tableau III: Classification des anomalies morphologiques des spermatozoïdes

Tableau IV : Tableau comparatif de proportions de concentration par deux méthodes cytométrie en flux et CASA

Tableau V : rapport de trois catégorie de la concentration

Tableau VI : comparaison de proportion de la viabilité des spermatozoides de chaque taureau par les deux méthodes cytométrie en flux et CASA

Tableau VII : comparaison entre la morphologie et l'oxydation des spermatozoides de chaque taureau.

Tableau VIII : Comparaison entre le niveau oxydatif et la vitesse de spermatozoids

Liste des abréviations

ADN : Acide Désoxyribonucléique

ALH : Amplitude of Lateral Head displacement

ATP : Adénosine triphosphate

BSP : Bovine Seminal Proteins

CASA : camputer

CNIAAG : centre national de l'insémination artificiel et l'amélioration génétique

°C : degré celcus

IA : insémination artificiel

IAM : membrane interne de l'acrosome

OAM : membrane externe de l'acrosome

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PM : membrane plasmique

ROS: Reactive oxygen species

SCA: sperm class analyser

STR: Straightness.

VAP: Velocity Straight Pathway

VCL: Velocity Curved Line

VSL: Velocity Straight Line

***Introduction
Générale***

L'amélioration des animaux d'élevage est une préoccupation majeure des éleveurs qui cherchent à sélectionner les meilleurs reproducteurs afin d'obtenir des descendants plus performants et mieux adaptés aux conditions d'élevage (Colombani, 2012).

En Algérie, le bovin est une source importante dans la production de viande et de lait. Pour cela, des efforts sont consentis dans ce sens par des essais d'amélioration génétique de nos races locales, l'importation de races étrangères à grande productivité, l'introduction des biotechnologies animales, notamment l'insémination artificielle et le transfert embryonnaire (Laghrou, 2012).

La production de semence commence par la collecte du sperme (Kabera, 2008). Ensuite les paramètres sémiologiques sont évalués principalement par l'analyse macroscopique de la semence puis par l'analyse microscopique. Une fois la qualité du sperme contrôlée, il peut être utilisé, sous forme fraîche, directement pour l'insémination artificielle, ou bien sous forme réfrigérée, si son utilisation est de courte durée sinon il peut être dilué puis cryoconservé. Une semence cryoconservée peut être maintenue durant plusieurs années (Rigal, 2008).

De ce fait, le succès de l'insémination artificielle dépend, en grande partie, de la qualité de la semence utilisée. C'est pourquoi il est important de disposer de techniques analytiques fiables permettant de l'évaluer (Cabannes, 2008).

Par ailleurs, le succès de l'insémination artificielle est fortement lié à la qualité de la congélation de la semence. En effet, durant le processus de congélation-décongélation, divers compartiment biochimiques et anatomiques du spermatozoïde peuvent être lésés altérant la capacité fécondante des spermatozoïdes (Briand-Amirat et al, 2006).

Plusieurs systèmes automatisés de mesure faisant appel à une assistance par ordinateur (CASA : Computer Assisted Semen Analysis) ont été développés. Le système d'analyse automatisée CASA est actuellement en place dans plusieurs laboratoires de référence afin d'estimer objectivement les caractéristiques de mouvement des spermatozoïdes.

Dans cette étude nous avons proposé d'étudier les principaux paramètres permettant d'évaluer la qualité des semences bovines (la concentration, la viabilité, la motilité, et la morphologie), ce qui répondra éventuellement à la demande du CNIAAG de confirmer ou infirmer les doutes émis par leur laboratoire, dans une évaluation préliminaire de leurs paillettes de sperme. Pour répondre à ce besoin on procédera par deux méthodes différentes : la cytométrie en flux et CASA dans un objectif de vérifier la complémentarité des deux techniques pour une efficacité exemplaire dans l'estimation et la caractérisation de la semence dans le but d'assurer la réussite après avoir congelé une semence chez le bovin.

Chapitre 1:
Revue
bibliographique

I. Rappel anatomo-physiologique de l'appareil reproducteur du taureau

L'appareil génital du taureau (Figure 1) est constitué par l'ensemble des organes chargés de l'élaboration du sperme et de son dépôt dans les voies génitales de la femelle (BARONE,2001). Le tractus génital du taureau comprend trois parties (HAZEN, 2009-2010) :

- **une partie glandulaire** composée des testicules et des enveloppes testiculaires (scrotum, dartos, gaine vaginale et crémaster) (figure1) ;
- **une partie excrétrice** représentée par les voies génitales (épididymes et conduits déférents) et les voies uro-génitales (urètre, pénis) ;
- **les glandes annexes** (prostate, glandes vésiculaires, glandes bulbo-urétrales) développées autour de la portion pelvienne de l'urètre. Ces glandes accessoires mêlent leurs produits de sécrétion au fluide testiculaire pour constituer le sperme.

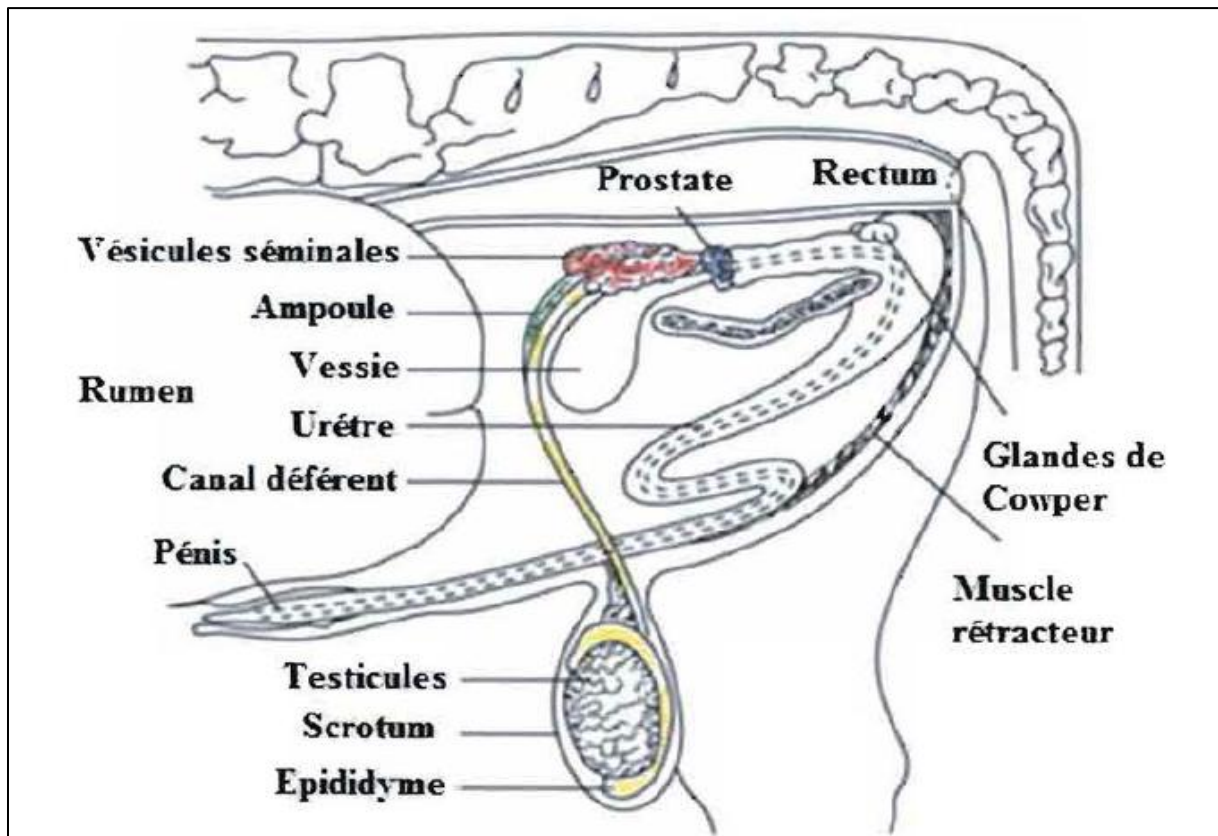


Figure 1 : schéma d'un appareil reproducteur du taureau (THIBIER, 1977).

I.1. Physiologie de l'appareil reproducteur du taureau

I.1.1. Production du sperme

Le sperme est un liquide opaque, blanchâtre produit au cours de l'éjaculation. Il est composé de spermatozoïdes en suspension dans le liquide séminal, qui est un mélange de sécrétions des différentes glandes génitales mâles (prostate, vésicule séminale.). Les spermatozoïdes représentent 20% et le liquide séminal 80% du liquide spermatique (Konfe, 2014).

I.1.2. Spermatogénèse

La spermatogénèse correspond à un processus de différenciation cellulaire qui aboutit à la production des spermatozoïdes à partir des spermatogonies souches. Elle commence à la puberté. La production des spermatozoïdes est continue au cours de la vie de l'animal et nécessite la prolifération des spermatogonies souches par mitose. L'entrée des spermatogonies souches dans le processus de spermatogénèse ou cycle séminal se fait à intervalles réguliers de 13,5 jours chez le taureau. La méiose est l'étape de brassage génétique permettant la formation de cellules haploïdes : les spermatides, à partir des spermatocytes (diploïdes).

La spermatogonie est l'étape de différenciation cytoplasmique qui permet la formation de cellules mobiles : les spermatozoïdes à partir de cellules rondes et immobiles : les spermatides. Cette étape correspond à de nombreux remaniements cytoplasmiques et à la condensation de la chromatine. 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 selon Hochereau et al, (1964), cité par Rigal (2008).

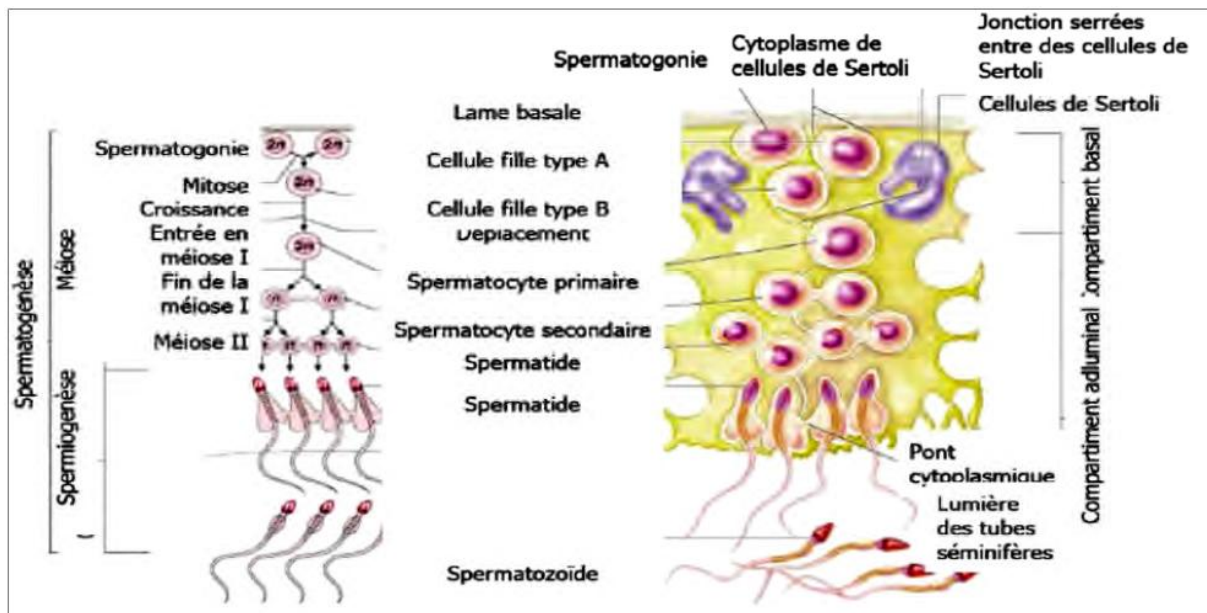


Figure 2 : Schéma des différentes étapes de la spermatogénèse chez les mammifères (Senger, 2012).

I.1.3. Structure du spermatozoïde

Le spermatozoïde normal mesure environ 70 μm chez le taureau. La tête du spermatozoïde est de forme ovoïde et aplatie, elle mesure 8 à 9 μm de longueur, 4 à 4,5 μm de largeur et 0,5 à 1 μm d'épaisseur. L'acrosome couvre environ 60% de la tête et forme sur le bord antérieur une crête apicale, sorte de bourrelet. La pièce intermédiaire fixée à la tête, forme un cylindre d'environ 10 à 12 μm de long et d'un diamètre de 1 μm . Le flagelle mesure de 52 à 55 μm de longueur pour un diamètre de 0,5 μm et se termine par une section filamenteuse de 0,2 μm de diamètre (Bahr et Zeitler, 1964).

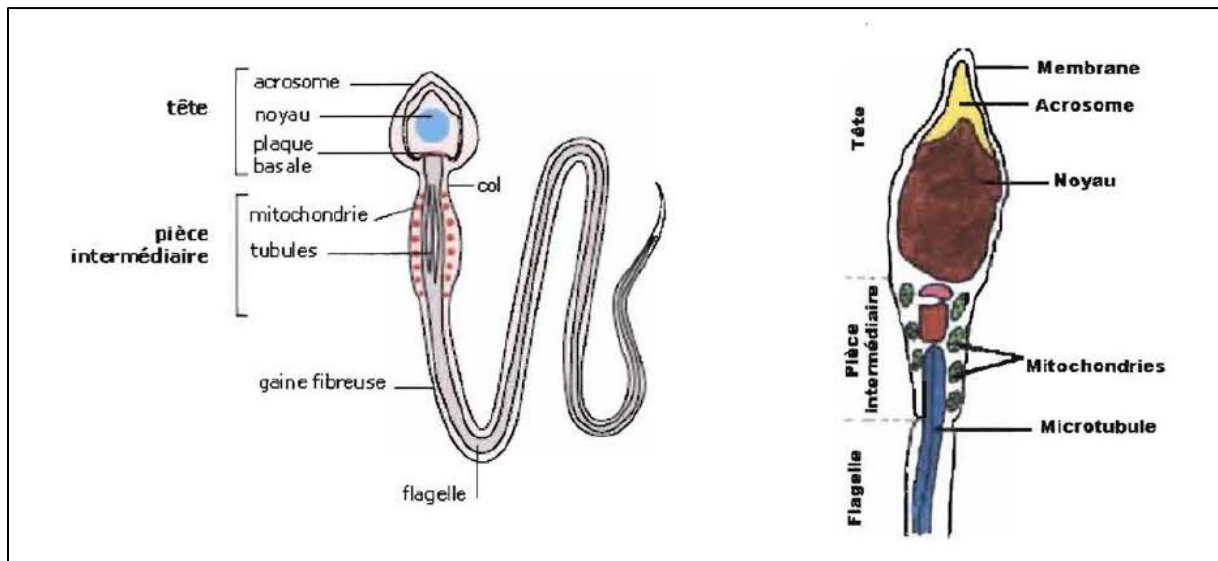


Figure 3 : Anatomie du spermatozoïde (In YAYE, 2009)

I.1.3.1. La tête

La tête est composée presque entièrement du noyau dont la portion antérieure est recouverte d'une vésicule : l'acrosome. Le noyau et l'acrosome sont entourés des composantes du cytosquelette et d'une petite quantité de cytoplasme (Eddy, 2006).

La tête du spermatozoïde est impliquée dans l'interaction du spermatozoïde avec l'ovocyte. La fonction principale des spermatozoïdes est de transférer l'information génétique au futur zygote. Ainsi le rôle du noyau est de conserver l'ADN et de le libérer au moment de la fécondation, lors de la fusion avec l'ovule. L'ADN contenu dans le noyau du spermatozoïde mature est haploïde. Chez les mammifères, le noyau du spermatozoïde est traditionnellement inactif (Imschenetzky et al, 2003), donc aucune nouvelle traduction, transcription ou acide nucléique ne peut être formée lorsque le spermatozoïde quitte le testicule. La chromatine nucléaire des spermatozoïdes est compactée à un degré de condensation six fois plus élevé comparativement au noyau des cellules somatiques (Ward et Coffey, 1991). Cette forte condensation est permise par le remplacement des histones somatiques par des protéines des protamines. Cette structure de protamine complexée à l'ADN est essentielle pour la protection de l'information génétique. L'intégrité de l'ADN est fondamentale pour le développement

normal du zygote. Le noyau du spermatozoïde est entouré d'une enveloppe nucléaire peu commune puisqu'elle est dépourvue de pores, et ce, autant sur les feuilletts nucléaires externes et internes (Eddy, 2006).

1.1.3.2. Le flagelle

Le flagelle des spermatozoïdes est responsable du mouvement et du transport des gamètes mâles. Le flagelle peut être divisé en quatre régions soit la pièce connective (cou), la pièce intermédiaire, la pièce principale et la pièce terminale. Le flagelle est composé d'un axonème, d'une gaine mitochondriale, de fibres denses et d'une gaine fibreuse. L'axonème est un complexe de microtubules qui consiste à un arrangement de neuf doublets de microtubules entourant une paire centrale. L'axonème est présent tout au long du flagelle. La gaine mitochondriale est située dans la pièce intermédiaire du flagelle des spermatozoïdes, elle est composée d'une centaine de mitochondries disposées de façon hélicoïdale autour des fibres denses. Cette portion du spermatozoïde est responsable de la production d'ATP par phosphorylation oxydative. Les fibres denses sont adjacentes au complexe axonémal et s'étendent de la pièce connective à la région postérieure de la pièce principale. La gaine fibreuse enveloppe les fibres denses au niveau de la pièce principale. Les différentes composantes du flagelle génèrent et forment les mouvements de vagues et propagent cette vague de la base à la pointe du flagelle.

I.2. Les étapes de la fécondation

La fécondation se produit en plusieurs étapes :

1- le spermatozoïde, ayant subi la capacitation, interagit avec la zone pellucide, et la réaction acrosomique se produit. Elle consiste en la libération du contenu acrosomique. Des protéines de surface (protéines ZP) formant un maillage au niveau de la zone pellucide, se lient à des récepteurs de la membrane plasmique du spermatozoïde, et ce de façon extrêmement spécifique à chaque espèce. Cette liaison entraîne une lyse de la membrane de l'acrosome et la libération de son contenu contre la zone pellucide.

2- les enzymes lytiques libérées désorganisent la zone pellucide et permettent la pénétration progressive de différents spermatozoïdes. La membrane interne de l'acrosome comporte des récepteurs maintenant la liaison entre le spermatozoïde et des protéines (ZP2) de la zone pellucide. Ainsi, les spermatozoïdes progressent dans la zone pellucide jusqu'à la membrane plasmique de l'ovocyte.

3- le spermatozoïde se plaque sur la membrane plasmique de l'ovocyte. Le noyau, le centriole, et parfois quelques mitochondries sont internalisés dans l'ovocyte.

Au stade de leur émission dans les voies femelles, les spermatozoïdes subissent encore un blocage fonctionnel qui les empêchera de féconder l'ovocyte. Une seconde étape est nécessaire, appelée la capacitation : il s'agit des dernières modifications dans les voies génitales femelles (essentiellement au niveau membranaire des spermatozoïdes) à l'issue

desquelles les spermatozoïdes progressent de manière optimale et sont prêts à subir la réaction acosmique.

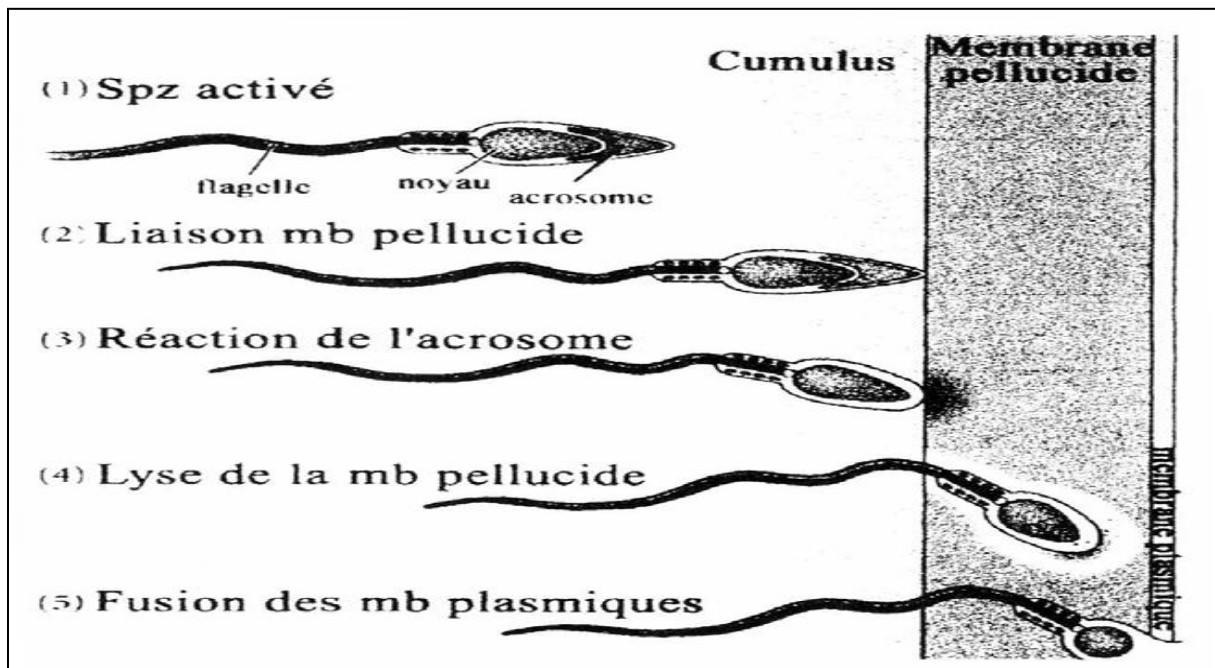


Figure 4 : schéma représente les étapes de la fécondation. (Kawa *et al*, 2010).

II. TECHNOLOGIE DE LA SEMENCE BOVINE

la semence est un produit préparé (dilué, conditionné, conservé) par une technique appropriée en vue de son emploi en insémination artificielle. L'ensemble des opérations de préparation de la semence bovine peut être comparé à une chaîne dont chaque maillon constitue un stade technologique très important (ADAMOUC-N'DIAYE *et al*, 2003). Une déféctuosité à une étape donnée porte préjudice à la qualité du produit final. Cette chaîne est chronologiquement découpée comme suit : la collecte du sperme, l'analyse du sperme récolté, la préparation de la semence, le conditionnement en doses individuelles, la congélation et la conservation à -196°C et en fin la décongélation de la semence congelée pour vérification de la qualité finale.

II.1. Méthodes de recolte du sperme

1. La collecte à l'électro-éjaculateur

L'électro-éjaculation permet de provoquer l'éjaculation par une stimulation électrique. Un générateur produit de l'électricité qui est transmise par l'intermédiaire d'électrodes à l'animal. L'interface tissu/électrodes (résistance interne) joue un rôle non négligeable car la stimulation électrique doit parvenir jusqu'aux nerfs pour provoquer l'érection et l'éjaculation. (Stievenart, 1991)

2. Collecte du sperme à l'aide du vagin artificiel

La collecte du sperme à l'aide du vagin artificiel constitue la technique la plus utilisée dans le monde au niveau de l'espèce bovine. C'est un procédé de recolte qui se rapproche le plus

des conditions naturelles d'éjaculation. Elle permet de simuler les conditions naturelles offertes par le vagin de la vache. (BOLY, 1986).

II.2. Préparation et conservation de la semence

Le sperme récolté contient un nombre de spermatozoïdes supérieur à celui requis pour la fécondation, donc une dilution avant l'usage est nécessaire afin d'accroître le volume de l'éjaculat et d'augmenter ainsi le nombre de vaches inséminées, le sperme dilué sera ensuite conditionné en petites doses puis conservé. (Kabera, 2008).

La dilution du sperme se fait par un dilueur qui permet d'apporter aux spermatozoïdes les éléments nutritifs et protecteurs permettant leur survie après congélation. En effet, un bon dilueur doit avoir un bon pouvoir tampon afin de limiter les variations de pH, des substances comme les protéines du jaune d'œuf qui empêchent la lésion de la membrane cellulaire des spermatozoïdes, et des substances antibiotiques pour garantir la qualité bactériologique de la semence (Gérard et Khirredine, 2002).

Le conditionnement se fait, généralement, en des paillettes en plastique. Chaque paillette portant des renseignements permettant la traçabilité de la semence (Rigal, 2008). Le mode de conservation de la semence dépend des délais d'utilisation. Pour une utilisation directe, la semence est maintenue dans un bain marie (thermos) à une température de 36 à 38°C. Pour une utilisation à long terme, la semence doit être conservée dans de l'azote liquide à -196°C. (Gérard et al., 2008).

II.3. Analyse de la qualité du sperme récolté

Elle consiste à apprécier les caractéristiques du sperme collecté, notamment celles en relation avec le pouvoir fécondant et les technologies de conditionnement. L'examen sémiologique de l'éjaculat comprend un examen visuel (macroscopique), un examen microscopique.

II.3.1. Examens macroscopiques

L'évaluation visuelle permet d'apprécier le volume de l'éjaculat, sa couleur et sa viscosité. Elle est rapidement réalisée après la collecte du sperme.

II.3.1.1. Volume

Le volume du sperme collecté varie selon l'espèce, et pour une même espèce donnée, il est fonction de l'état physiologique de l'individu, de l'âge, de la saison, de la race, de la méthode de récolte ou encore des conditions sanitaires et alimentaires. Le volume du sperme est également influencé par des facteurs psychiques et environnementaux selon (Parez et Duplan, 1987) cité par (Konfe 2014).

II.3.1.2. Couleur de l'éjaculat

Le sperme normal de taureau est de couleur blanchâtre selon (Parez et Duplan,1987) cité par (Konfe 2014).. Cette couleur peut être cependant modifiée pour des raisons d'ordre physiologiques et surtout pathologiques. La couleur jaune du sperme est due à une teneur élevée en carotène provenant des vésicules séminales. Elle peut également résulter de la présence de pus ou d'urine dans le sperme. Une coloration rosâtre ou rougeâtre traduit la présence de sang dans le sperme. La coloration brunâtre traduit la présence de sang altéré ou d'éléments sanguins dégénérés dans le sperme ou une inflexion. La couleur bleue de l'éjaculat est due à une faible concentration en spermatozoïdes ou l'administration de bleu de méthylène (Konfe 2014).

2.3.1.3. Viscosité

La viscosité du sperme est fortement tributaire de la concentration en spermatozoïdes. L'éjaculat est d'autant plus visqueux que le nombre de spermatozoïdes est élevé. Comparé à l'eau distillée, le sperme normal de taureau a une viscosité de 3,7selon (Parez et Duplan,1987)cité par(Konfe 2014).

II.3.1.4. pH du sperme

Le pH du sperme est mesuré à l'aide d'un pH-mètre ou à l'aide du papier indicateur. C'est une mesure qui se fait immédiatement après la récolte. En effet le sperme s'acidifie rapidement par formation d'acide lactique. Le pH du sperme normal est compris entre 6,5 et 6,8chez le taureau selon (Hanzen, 2009) cité par (Konfe 2014).

II.3.1.5. Poids spécifique

Le poids spécifique du sperme dépend du rapport entre la concentration en spermatozoïdes et le volume du plasma séminal. Il est de 1.035 chez le taureau (Konfe 2014).

Tableau I : Paramètres séminologiques du taureau (d'après Cupps, 1991).

	Paramètres séminologiques
Volume (ml)	2 – 10
Concentration en spermatozoïdes (x 10⁶/ml)	300 – 2000
Mobilité moyenne	70% de spermatozoïdes mobiles
pH	6,48 – 6,99
Spermatozoïdes normaux %	89
Nombre moyen de spermatozoïdes par éjaculat	7000 x 10 ⁶

II.3.2 Examens microscopiques :

Ils consistent à évaluer la motilité des spermatozoïdes, la vitalité, la concentration en spermatozoïdes de l'éjaculat, la morphologie des spermatozoïdes ainsi que le statut oxydatif.

II.3.2.1 Motilité

La motilité des spermatozoïdes est un élément clé d'appréciation de la qualité de l'éjaculat. C'est un examen classique, constant et obligatoire sur lequel on se base pour effectuer une première élimination des éjaculats considérés comme inaptes à la congélation (GOFFAUX,1986). Un autre examen de la motilité est également réalisé sur un autre échantillon de semence décongelée avant la mise en stock définitive. Ce dernier examen donne lieu à une dernière élimination des éjaculats inaptes. On distingue deux types de motilité : la motilité massale et la motilité individuelle.

A/ Motilité massale

L'examen de la motilité massale est effectué le plus rapidement possible après le prélèvement du sperme en le maintenant rigoureusement à une température voisine de 38°C, car elle diminue très rapidement. Les spermatozoïdes se déplacent habituellement de manière rectiligne. La motilité massale dépend essentiellement de trois facteurs : la concentration, le pourcentage de spermatozoïdes mobiles et de la vitesse de déplacement des spermatozoïdes.

Chez le taureau, l'intensité et le nombre des mouvements se traduisent par de véritables vagues observables après le dépôt d'une goutte de sperme sur une lame préchauffée (37-38°C) et son examen à faible grossissement (x 40 à 100) au microscope à platine chauffante. La motilité massale est affectée d'une note variant (Tableau II) (PAREZ et DUPLAN,1987). Cette note est souvent convertie en un pourcentage approximatif de spermatozoïdes mobiles.

Tableau II : Notation de la motilité massale du sperme dans l'espèce bovine (Rukundo, 2009)

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

L'examen de la motilité massale ne donne qu'une idée approximative du pourcentage de spermatozoïdes mobiles. L'examen de la motilité individuelle permet de cerner le pourcentage de spermatozoïdes mobiles.

B/ Motilité individuelle

Est mesurée au microscope optique à un agrandissement 200x entre lame et lamelle, elle correspond à la proportion de spermatozoïdes avec un mouvement rectiligne qui traversent le champ du microscope. Les spermatozoïdes bougeant sur place, tournant en petits cercles ou se déplaçant en arrière du fait d'une queue repliée ne sont pas considérés comme mobiles selon (Gérard et Khirredine, 2002) cité par (Rigal, 2008)

II.3.2.2. Vitalité

Le pourcentage de spermatozoïdes vivant est apprécié au microscope optique sur un frottis de sperme coloré à l'éosine-nigrosine. Les spermatozoïdes dont la membrane est endommagée (morts) se laissent pénétrer par le colorant et apparaissent en roses (éosine) sur le fond blanc (nigrosine) alors que les spermatozoïdes vivants ayant une membrane intacte apparaissent incolores.

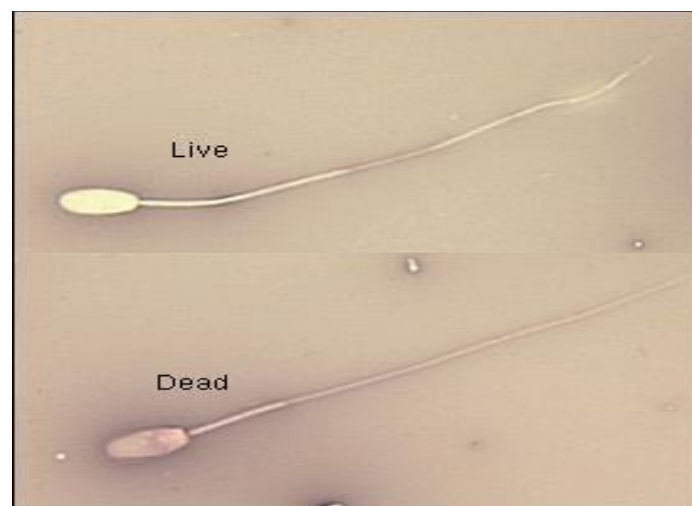


Figure 5 : photo représente un spermatozoïde vivant incolore et un spermatozoïde mort coloré en rose observé au microscope optique

<https://www.google.com/search?q=la+vitalité+des+spermatozoïdes&source> consultée le 11.09.2018

II.3.2.3. Morphologie

L'étude de la morphologie des spermatozoïdes permet de détecter les différentes anomalies morphologiques touchant ces différentes parties du spermatozoïde. L'examen morphologique est également basé sur la technique de coloration. Plusieurs techniques de coloration sont rencontrées: coloration au colorant de Giemsa, à l'encre de Chine, au rose Bengale, au bleu opale, au fluo-chromes. Cependant, la coloration à l'éosine-nigrosine reste la plus utilisée. Trois types de classification de la morphologie des spermatozoïdes sont généralement rencontrés dans la littérature. Le premier type de classification se base sur le site de dysfonctionnement du spermatozoïde. Il sépare les anomalies en anomalies primaires et en anomalies secondaires. Les anomalies primaires seraient des anomalies qui se sont produites

durant la spermatogénèse au niveau des tubes séminifères alors que les anomalies secondaires seraient des anomalies qui ont lieu après la spermatogénèse notamment au cours de la maturation dans l'épididyme ou lors de l'éjaculation. En effet certaines anomalies comme les gouttelettes proximales classées comme anomalies secondaires se sont par la suite révélées être une malformation lors de la spermatogénèse et non un dysfonctionnement au niveau de l'épididyme(PAREZ et DUPLAN, 1987).

Tableau III: Classification des anomalies morphologiques des spermatozoïdes (Dumont, 1997)

Anomalies de flagelle	Flagelle replié
	Flagelle rudimentaire ou cassé
	Flagelle enroulé
Anomalies de la pièce intermédiaire	Pièce intermédiaire dédoublée
	Déformations de la pièce intermédiaire
	Gouttelette cytoplasmique proximale
Anomalie de la tête	Tête piriforme
	Tête repliée
	Tête décapitée
	Tête ronde

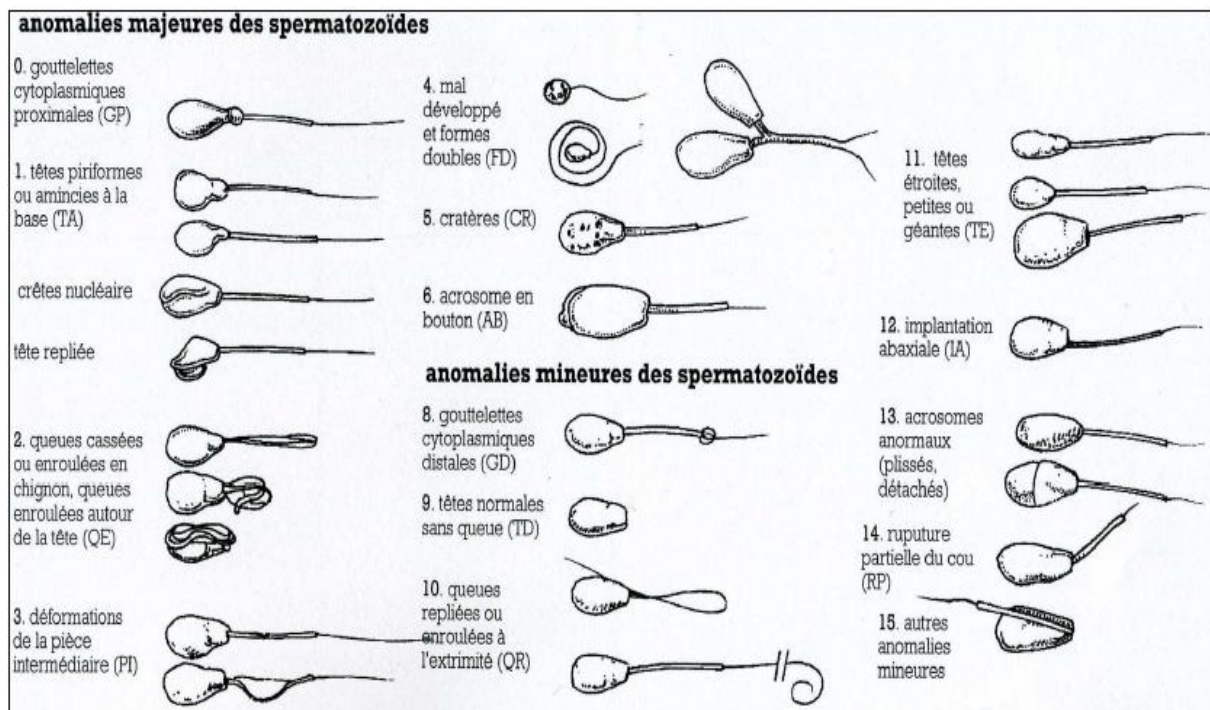


Figure 6 : schéma d'anomalies majeures et mineures de spermatozoïdes dans l'espèce bovine (Dumont, 1997)

II.4. Techniques d'analyse de la semence

II.4.1. CASA Computer -Assisted Semen Analysis

CASA est l'acronyme de « Computer-Assisted Semen Analysis » en Anglais qui peut se traduire en français par système informatisé d'analyse de sperme. Il constitue un outil qui est de plus en plus intégré dans les laboratoires de biologie médicale, permettent la mesure et le calcul de nombreux paramètres du spermogramme : la motilité, la concentration des spermatozoïdes, les caractéristiques morpho métriques (telle la longueur, la largeur, le périmètre et surface de la tête, la longueur du flagelle) et les anomalies morphologiques (flagelle enroulé, cassé, vacuoles). (OPTMQ 2016). Il fournit donc une évaluation quantitative et qualitative simple et rapide du sperme bovin .En suivant les indications et les critères établis par l'OMS.

II.4.2. Cytométrie en flux

L'application de la cytométrie en flux minimise, en partie, plusieurs difficultés d'analyse rencontrées. La cytométrie en flux est une approche automatisée capable de mesurer la quantité d'un ou de plusieurs marqueurs fluorescents associés avec la cellule de manière non biaisée. Cet appareil offre des propriétés incomparables de précision, de sensibilité, de rapidité et permet l'analyse multiparamétrique sur un nombre de cellules statistiquement approprié (Cordelli et al., 2005). De plus, la découverte d'une variété de fluorochromes et de composants conjugués à une sonde fluorescente rend possible une grande gamme d'analyses pour l'évaluation de la semence à des niveaux biochimiques, ultra structuraux et fonctionnels (Gillan et al, 2005).

II.4.2.1 viabilité cellulaire et concentration par cytométrie en flux

Un spermatozoïde viable est défini comme une cellule qui possède une membrane plasmique intacte. Cet attribut est évalué par la coloration d'un échantillon de sperme avec l'iodure de propidium (PI), une sonde fluorescente qui se lie à l'ADN. En effet, le PI se lie sélectivement et quantitativement au niveau de la structure poly nucléotidique en double hélice en s'intercalant entre les paires de bases des acides nucléiques (le Pecq et Paoletti, 1967). Une membrane plasmique intacte, empêche la pénétration du PI à l'intérieur de la cellule, contrairement à une membrane endommagée. Dès qu'il pénètre dans la cellule, le PI se lie à l'ADN, ce qui provoque l'apparition d'une fluorescence rouge dans les cellules dont la membrane plasmique est endommagée. Par contre, aucune fluorescence n'apparaît dans les cellules dont la membrane plasmique est intacte (Graham e al. 1990 ; Wilhelm et al. 1996). L'utilisation du PI permet aussi de déterminer la concentration en spermatozoïdes en même temps que l'évaluation de la viabilité (Eustache et al. 2001).

II.4.2.2. Statut d'Oxydation (Stress Oxydatif et radicaux oxygénés libres)

Le processus de cryopréservation peut être à l'origine de la production de radicaux oxygénés libres notamment, responsables de dommages sur la cellule (Calamera, Fernandez et al.2001); (Neild,Gadella Et al.,2003). La Présence de radicaux libres au sein du spermatozoïde a été corrélée à une diminution de la mobilité (Baumber,Ball Etal.,2000), à Une diminution de la capacité de fusion avec l'ovocyte (Aitken,1989) et à de l'infertilité (Agarwal,Makker Et al., 2008) Les EOR sont donc des molécules qui sont pour la plupart très réactives avec les différents composants cellulaires. Elles jouent des rôles physiologiques indispensables au dialogue intercellulaire, à la protection immunitaire, au maintien de l'homéostasie en dioxygène, à la régulation de l'apoptose). Des niveaux physiques de ROS sont requis pour les fonctions normales des spermatozoïdes telles que l'hyperactivation, la capacitation, la réaction à l'acrosome et la fusion des ovocytes. Cependant, en cas d'excès, les ROS peuvent endommager l'ADN, inhiber la fusion spermatozoïdes-ovocytes et réduire la motilité des spermatozoïdes (Awda, 2009). Le stress oxydatif se produit dans les spermatozoïdes lorsque les niveaux intra-et extra cellulaires de ROS dépassent la capacité antioxydante disponible. Les spermatozoïdes ont une quantité limitée de cytoplasme cellulaire dans lequel se trouvent des enzymes de récupération, ce qui rend les spermatozoïdes très sensibles aux dommages causés par les ROS (Henkel ,2005).

II. 5. La cryopréservation des spermatozoïdes bovins et ses dommages

Au sein des troupeaux laitiers, l'utilisation de la semence cryopréservée en insémination artificielle constitue présentement la norme. La cryopréservation de la semence a l'avantage de conserver et de préserver le pouvoir fécondant de la semence pendant plusieurs jours voire même des années. De plus, une fois congelée la commercialisation et le transport de la semence est grandement facilitée. L'industrie de l'insémination artificielle a mis au point un procédé de congélation limitant les dommages causés aux spermatozoïdes.

Bien que la cryopréservation soit une méthode de conservation de la semence avantageuse pour l'insémination artificielle, elle entraîne néanmoins des dommages importants aux spermatozoïdes. La cryopréservation des spermatozoïdes représente une interruption artificielle de la progression des spermatozoïdes autour de la maturation post-éjaculation et de la fécondation. Malgré tous les travaux réalisés pour améliorer le processus de congélation, la cryopréservation induit des dommages importants aux spermatozoïdes. En fait, encore 40 à 50 % des spermatozoïdes meurent suite aux procédures de congélation/décongélation.

II.6. Les tests de fertilité

Le but de l'analyse de la semence est de déterminer le potentiel de fécondation d'un échantillon de semence (fraîche, congelée/décongelée) et de révéler la fertilité au champ du mâle de qui provient la semence. Dans les centres d'insémination artificielle, lors de la récolte de la semence des taureaux, les principaux paramètres analysés pour évaluer la qualité de la semence, avant sa cryopréservation, se résument à l'évaluation subjective de la motilité,

l'estimation de la proportion de spermatozoïdes vivants, ayant une physiologie normale et l'approximation de la concentration de l'échantillon en cellules spermatiques.

Pour assurer la fécondation, les spermatozoïdes doivent posséder plusieurs caractéristiques telles que la production d'ATP, l'induction de l'hyperactivation, l'habileté à capaciter et à subir la réaction de l'acrosome, une membrane plasmique fonctionnelle, l'habileté à reconnaître et à se lier à la zone pellucide, posséder un ADN intact etc. Les spermatozoïdes sont donc des cellules complexes, multifonctionnelles nécessitant le bon fonctionnement de plusieurs paramètres pour atteindre leur but ultime : la fécondation. L'infertilité d'un taureau peut être causée par une variété de raisons. Pour cette raison, un test évaluant un paramètre des spermatozoïdes parvient difficilement à détecter un spermatozoïde défectueux pour une propriété autre que celle évaluée par le test, surestimant ainsi la fertilité de l'échantillon (Graham et Moce, 2005). Par conséquent, il est peu probable qu'un test en laboratoire évaluant un paramètre des spermatozoïdes soit en mesure de détecter la proportion de spermatozoïdes contenant l'ensemble des paramètres nécessaires pour féconder l'ovocyte et assurer le développement embryonnaire. C'est pourquoi les tests multiparamétriques s'avèrent intéressants. En fait, l'analyse de plusieurs paramètres d'un échantillon de spermatozoïdes permet d'obtenir un point de vue global de l'échantillon analysé et améliore la détection d'un paramètre déficient. De cette façon, l'analyse multiparamétrique pourrait permettre de mieux expliquer les écarts de fertilité entre les différents taureaux analysés (Januskauskas et al, 2000).

II.7. L'insémination artificielle

Chez les bovins, l'insémination artificielle consiste à injecter directement, à l'aide d'une tige, environ 10 à 20 millions de spermatozoïdes dans la cavité utérine de la femelle en période péri ovulatoire, l'industrie laitière repose, actuellement, presque entièrement sur cette technique de reproduction assistée. Un des avantages de l'insémination artificielle est l'augmentation du coefficient de diffusion des mâles de qualités reconnues. En fait, un seul éjaculat d'un taureau peu permettre d'inséminer des centaines de vaches. Cette méthode de reproduction possède de nombreux avantages, elle permet une plus grande accessibilité aux taureaux de potentiel génétique supérieur, elle permet d'augmenter la diversité des taureaux disponibles pour les éleveurs de plus, en éliminant les contacts entre les animaux, elle limite la transmission de maladies. L'insémination artificielle dans les troupeaux nécessite une bonne détection des œstrus afin de réaliser l'insémination au moment opportun et ainsi améliorer les chances de fécondation.

Chapitre 2:
Materiel
et
Méthodes

Dans cette étude nous avons proposé d'étudier les principaux paramètres permettant d'évaluer la qualité des semences bovines, par le CASA nous avons la réalisation des paramètres suivant : la concentration, la viabilité, la motilité, la morphologie des spermatozoïdes puis nous avons l'étude statistique, et par la cytométrie en flux nous avons la réalisation des paramètres suivant : la concentration, la viabilité, le statut d'oxydation des spermatozoïdes, puis nous avons comparé entre les résultats des ces paramètres.

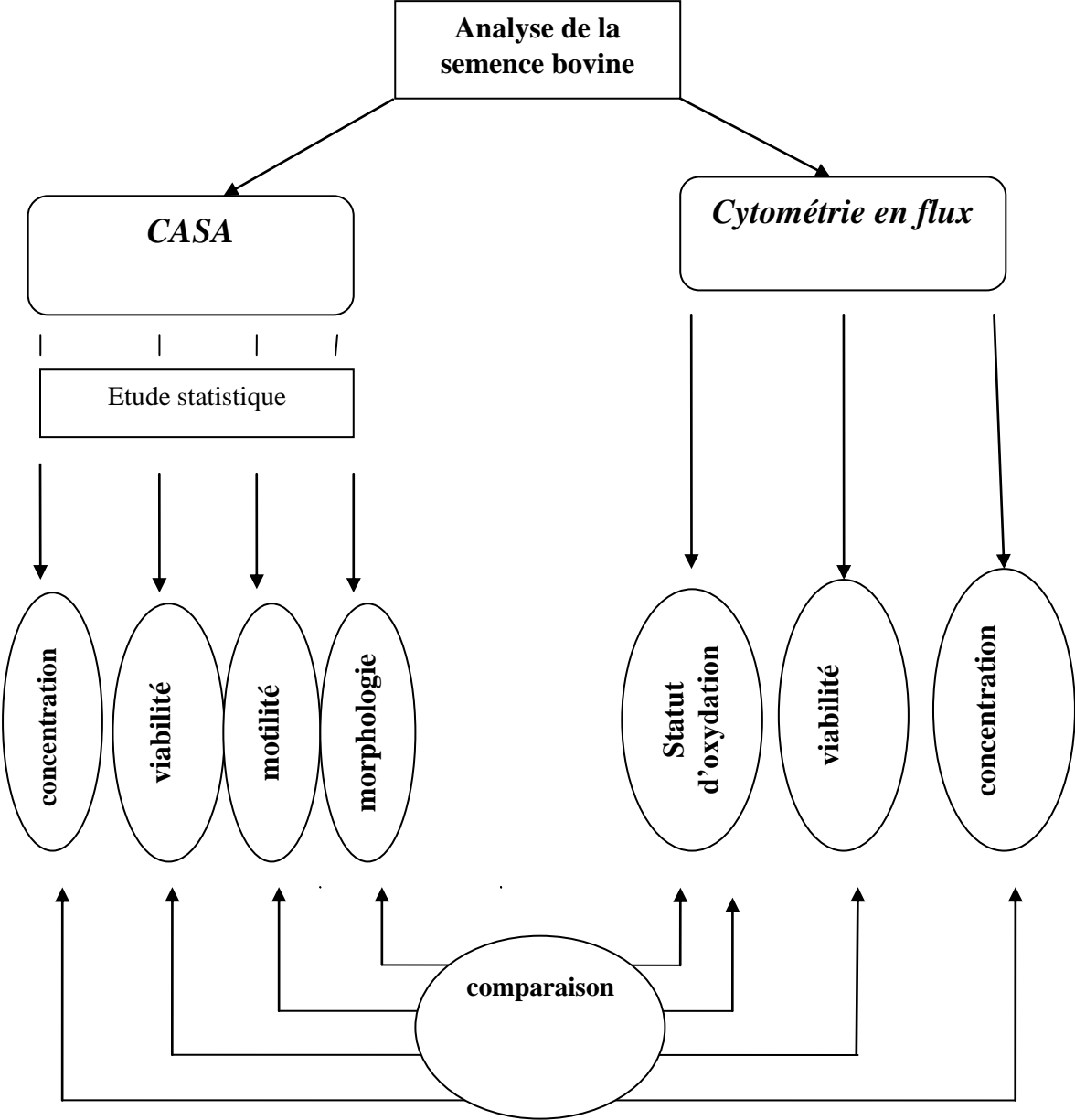


Figure 7: Organigramme général de travail

L'objectif de ces travaux était de caractériser les spermatozoïdes bovins cryopréservés via la cytométrie en flux et le CASA en étudiant, simultanément, différents paramètres tels que la viabilité, la concentration, la motilité, la morphologie, et le niveau de l'oxydation. D'évaluer ces paramètres suite à la décongélation des spermatozoïdes cryopréservés et également relier les résultats de ces paramètres avec la fertilité observée de différents taureaux au champ. Cet objectif coïncide avec le besoin qu'avait le CNIAAG de vérifier la qualité de quelques paillettes de spermes décongelées récemment dont son laboratoire de production avait émis un doute quant à la bonne qualité de ces paillettes qui concernent les 14 taureaux ayant fait l'objet de cette étude.

Nos expérimentations ont été réalisées dans la période du 2 mai au 4 juillet 2018 entre le laboratoire de production à centre national d'insémination artificielle et d'amélioration génétique pour les manipulations du cytométrie en flux et le laboratoire de reproduction animale à l'institut des sciences vétérinaire –Blida pour les manipulations du CASA. Les paillettes ont été transportées à température basse (-196 c°) dans l'azote liquide au LBRA à ISV

I. Matériel

I.1. Semences (paillettes)

Des paillettes prises au hasard, issus de 14 taureaux de races différentes .ces paillettes ont été récupérées à partir de Centre National d'Insémination Artificielle de l'Amélioration Génétique (CNIAAG) Baba Ali –Alger. La collecte de la semence des taureaux a été effectuée dans les périodes des années (2017/20018).

Tableau IV: les races de chaque taureaux et les dates de récolte pour chacun.

<i>Taureaux</i>	<i>Races</i>	<i>Date de récolte</i>
RAMY	Monbéliarde	30.01.2018
JEZINA	Monbéliarde	08.02.2018
CHARLY	Monbéliarde	19.04.2017
REDY	Fleckvie	03.12.2017
STRONG	Fleckvie	17.01.2018
SYMBA	Fleckvie	15.09.2017
SERVUS	Fleckvie	03.12.2017
JEFRY	Pie rouge holshtein	29.11.2017
IOTA	Pie rouge holshtein	26.03.2018
MARBOUH	Pie rouge holshtein	29.11.2017
MABROUK	Pie rouge holshtein	27.03.2017
ISYJET	Normande	21.02.2017
Jotengen	Normande	28.11.2017
HEALTOP	Pie noir holshtein	28.11.2017

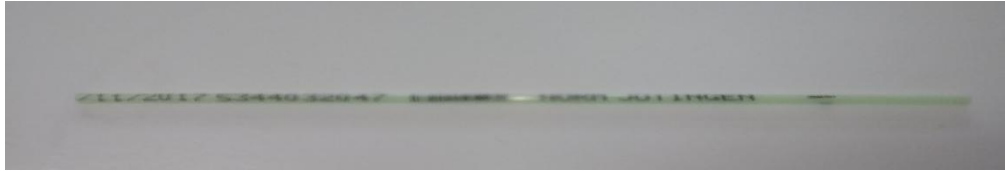


Figure 8 : une photo d'une paillette de la semence bovine.

I.2. Matériel de laboratoire

1) Sperm Class Analyzer®

Le Sperm Class Analyzer® (SCA®) est un système CASA (Computer Aided Semen Analysis) qui permet de gérer et d'analyser les échantillons de sperme humain en suivant les critères de l'O.M.S.

- Les composants basics du système sont :
 - microscope contraste de phase
 - caméra
 - Un ordinateur (consulter le minimum requis) avec le logiciel d'analyse (SCA®) installé.
- Autres matériel (voir l'annexe).



Figure 9 : photo d'un analyseur de sperme assisté par ordinateur (CASA) SCA® (photo personnel)

2) cytométrie en flux

La Cytométrie en flux est une analyse multiparamétrique de cellules individuelles. Les Cellules sont dissociées utilisées sous forme de suspension en utilisant un principe de mécanique des fluides-l'hydro-focalisation ou focalisation hydrodynamique. La Solution contenant la suspension de cellules à analyser est amenée par un injecteur jusqu'au centre d'une buse, dans laquelle le liquide dit « Degaine » Est poussé avec une pression plus ou moins élevée, dont va dépendre la vitesse de défilement des cellules (Ronot Etal., 2006; Shapiro, 2005). L'intensité de pression s'appliquées sur le liquide va modifier la vitesse du flux, cependant si la vitesse augmente, on observera une perte de qualité et une diminution du centrage, ayant pour conséquence la modification de la fluorescence. Concernant la qualité du

liquide, il faudra privilégier un liquide dit « Degaine», ayant une densité identique à celle de l'échantillon à analyser.

L'analyse des cellules est possible grâce à une source d'excitation lumineuse, qui frappe les cellules, et permet l'émission d'une fluorescence due aux fluorochromes utilisés pour le marquage. La Source d'excitation lumineuse est un laser qui permet l'obtention d'une lumière monochromatique ainsi qu'un faisceau centré et dirigé. La Majorité des appareils de mesure possède un laser de type Argon Ce qui entraîne une excitation lumineuse à deux pics, de 488 et 514 Nm de longueur d'onde. Le Type de lasers et ses caractéristiques intrinsèques seront donc importants à prendre en compte dans le choix des sondes de marquages. La Quantité de fluorescence émise par les cellules est proportionnelle à l'intensité de l'excitation mais aussi à l'intensité du marquage réalisé.



Figure 10 : Cytométrie en flux EasyCyte IMV (photo personnel)

II. Méthodes

II.1. CASA

II.1.1. La motilité

Selon un protocole décrit par Purday et Graham (2004) :

Le réchauffement du sperme de taureau a été fait aussi rapide que possible .la paillette a été tout d'abord secouée pour en faire tomber le reste de l'azote liquide puis plongée et agitée dans de l'eau a 34-37 °C. La décongélation s'était observée au bout d'une trentaine de second . Le contenu de la paillette décongelée a été diluée dans un tube eppendorf à l'ordre d'un V : V (250µl de la semence +250µl de la Nacl à 0.9%). Cette étape a été pratiquée, toujours, dans des conditions thermiques proches de 37°C (dans un bain marie). Dépôt d'un échantillon assez riche et bien homogène de 10 microlitres sur une lame de verre que l'on recouvrira, par dépôt horizontal, avec une lamelle de verre de 22 x 22 mm dans ces condition, l'espace obtenu entre lame et lamelle a été de l'ordre de 10 à 20 micromètres. Cet espace est suffisant pour bien observer le mouvement ondulatoire des spermatozoïdes qui évolueront dans cette épaisseur liquidienne. L'analyse cinématique a été faite grâce un objectif de grossissement 10x et Ph- au-dessus d'une platine chauffante intégrée (37°C) dans le microscope. Ce dernier comporte une source lumineuse avec un filtre vert. L'analyse se fait grâce un logiciel SCA®CASA, sous l'ongle de SCA Mobilité®. Cette étape a été faite par la digitalisation des images obtenues par la caméra. Ces images sont ensuite traitées par un ordinateur intégré qui permette définir de façon objective et répétable des paramètres tels que la proportion de spermatozoïdes mobiles, leurs vitesse, la linéarité de leurs trajectoires et la mobilité latérale de la tête .Après avoir analysé la mobilité, nous avons exportés les données obtenues (les différentes paramètres cinématiques) sous forme d'Excel.

II.1.2. la viabilité

Une coloration à l'éosine-nigrosine est utilisée pour évaluer le pourcentage de spermatozoïdes vivants, une heure après récolte du sperme. 10 µl de sperme dilué et 10µl d'éosine sont mélangés avec précaution. Après 30 secondes, 10µl de nigrosine sont ajoutés et le tout est à nouveau mélangé. 10 µl de ce mélange sont étalés sur lame de verre, le séchage se fait à l'air libre et l'observation est réalisée au microscope, grossissement x100, à immersion. Les spermatozoïdes morts sont colorés en rose. On compte le nombre de spermatozoïdes morts et vivants sur un total d'au moins 200 spermatozoïdes.

II.1.3. La morphologie

La même lame ayant était utilisée pour le comptage des spermatozoïdes vivants et morts est utilisée pour déceler les anomalies sur 200 spermatozoïdes, et cela en utilisant toujours le système CASA à grossissement x20. On peut distinguer plusieurs types d'anomalies qui sont liées soit à la tête, pièce intermédiaire ou bien à la queue des spermatozoïdes.

II.1.4. étude statistique par ACM

ACM analyse des correspondance multiple, avec un changement des valeurs numérique en valeurs qualitative. En prenant le classement de valeurs plus faible à plus élevé convertie en deux modalité « forts et faible » en utilisant un logiciel statistica StatSoft inc OK.

II.2. Cytométrie en flux

Le lavage de l'appareil est l'étape commune qui précède tous les tests effectués par le cytomètre .

II.2.1. Tests de viabilité et concentration

- La viabilité a été évaluée en utilisant Easykit 1. Pour chaque échantillon, un puits provenant d'un puits de 96 puits prêt à l'emploi.
- la plaque a été remplie de 200 µl d'EasyBuffer, puis de 2 mL sperme dilué (40 000 spermatozoïdes) ont été incorporés dans le puits.
- La plaque de puits a été incubée pendant 10 minutes dans un incubateur à 37 ° C à l'abri de la lumière.
- Les résultats ont été exprimés en fonction du pourcentage de spermatozoïdes «vivants», le pourcentage de sperme "moribond" et le pourcentage de "morts« sperme.

II.2.2. Test d'oxydation :

Faire un lavage de l'appareil, et remplir les microcupules de la plaque EasyKit 2 : 198µl easy Buffer + 2µl de semence, après nous avons incubé la plaque de puits pendant 30min à l'abri de la lumière. Obtenir les résultats sur le logiciel CytoSoft sous forme des graphiques de nuage de points et des tableaux de donnés.

Chapitre 3:
Résultats
et
discussion

Dans cette partie nous avons exposé l'ensemble des résultats obtenus dans notre travail.

Nous commençant d'abord par les résultats par la méthode de CASA.

I. Résultats par CASA

I.1. Motilité

La classification des spermatozoïdes par leurs mobilités et leurs vitesses et la progression est présentée dans les figures 14, 15 et 16. Ces résultats nous montre que les spermatozoïdes de notre étude sont immobiles (statiques) avec un pourcentage de 19.85 %. Cette proportion représente 2.29 % des spermatozoïdes progressifs rapides et 6.66 % progressifs moyens .cependant le pourcentage des spermatozoïdes rapides est 18.78% avec 14.89% qui sont moyen et 60.27% pour les spermatozoïdes lents.

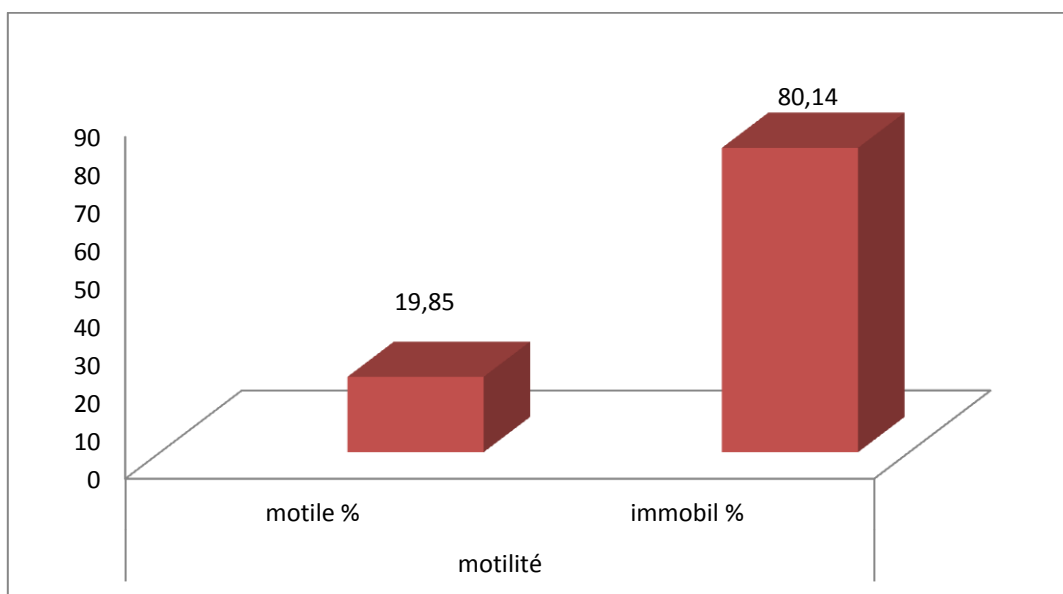


Figure 11 : présentation de proportion de spermatozoïdes mobiles et immobile

L'utilisation de CASA pour le calcul de la motilité des échantillons nous a permis d'obtenir un résultat après trois tentatives et nous avons constaté qu'ils sont très faibles et ont atteint les taux les plus faibles par rapport au données bibliographiques ces derniers montrent que la proportion appropriée de motilité normale des spermatozoïdes bovins de $\geq 60\%$ (Selon PAREZ et DUPLAN, 1987).

Nous expliquons ces faibles proportion en raison de procédure de congélation / décongélation des paillettes ou bien les conditions de congélation. Ces résultats confirment les doutes du laboratoire de production du CNIAAG au sujet de la bonne qualité du sperme.

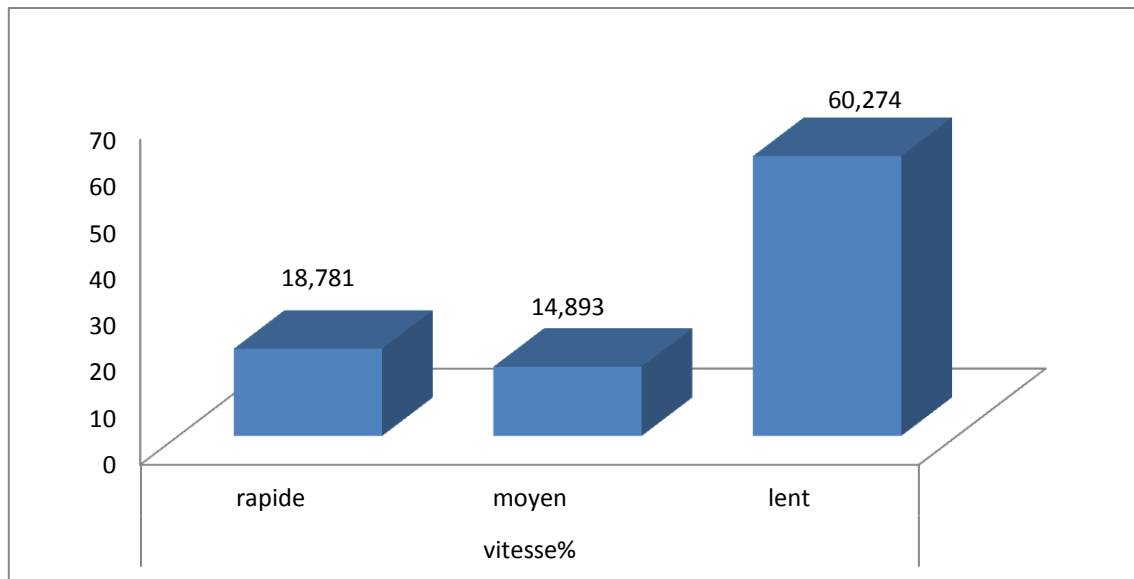


Figure 12 : présentation de proportion de spermatozoïdes rapide lent et moyen analysés par CASA

L'utilisation de CASA pour évaluer la vitesse des spermatozoïdes nous a donné trois phénomènes la vitesse rapide, la vitesse moyen et la vitesse lente, cette dernière a une très grande proportion (60.27 %) (figure15), et par conséquent la vitesse a une forte relation avec la motilité plus la mobilité est faible plus la vitesse est lente ceci peut être expliqués par procédure de congélation /décongélation des paillettes.

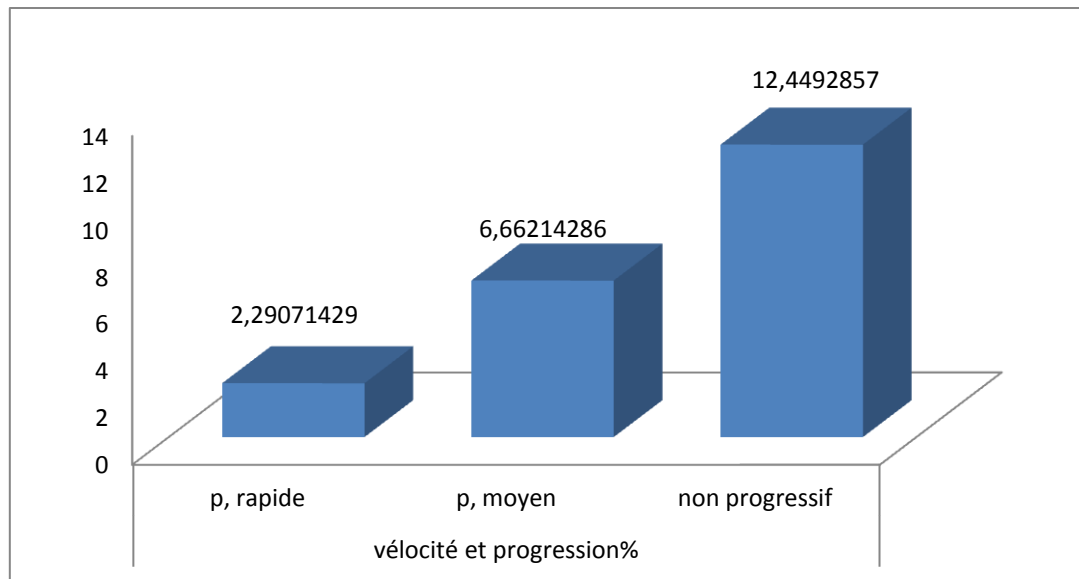


Figure 13 : présentation de proportion de progression de spermatozoïdes analysés par CASA

L'évaluation de ce paramètre nous a donné deux population de spermatozoïdes la première non progressif avec un pourcentage de 12.44 % et la deuxième progressifs avec un pourcentage de 8.9 % avec 6.6% et pour les spermatozoïdes progressifs moyens et 2.90 % pour les spermatozoïdes progressifs rapides .Nous observons que le taux de spermatozoïdes non progressifs est plus élevé par rapport les progressifs et le taux de progression moyenne est plus au moins supérieur à cela de progression rapide. Ces résultats nous ont permis de confirmer la relation entre les paramètres de motilité : plus la mobilité est faible plus les spermatozoïdes et non progressifs et plus la vitesse est lente.

I.2. viabilité

La proportion de spermatozoïdes vivants et morts et présentée par la figure 17

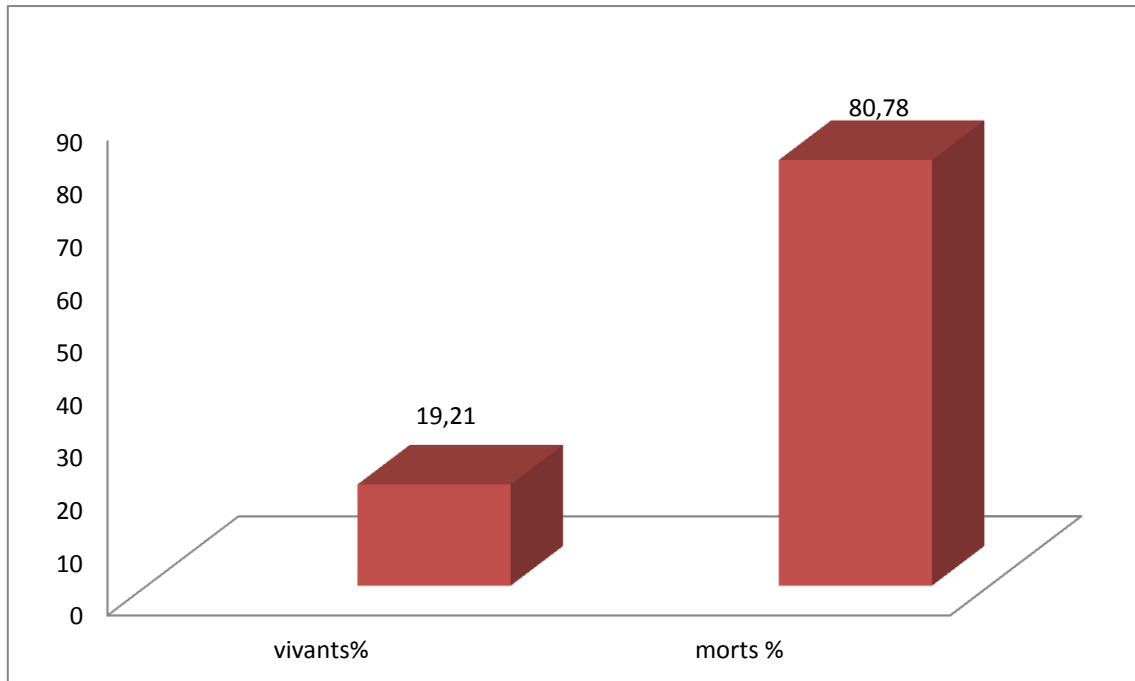


Figure 14 : moyenne de taux de spermatozoïdes vivants et morts analysés par CASA

Après la coloration par éosine-nigrosine nous avons observé deux population distinctes de spermatozoïdes la première population colorée en rose représente les spermatozoïdes morts avec un pourcentage de 80.78 % et la deuxième population colorées en blanc représente les spermatozoïdes vivants avec un pourcentage de 19.21 %. Ces résultats nous ont permis de constater que le taux de spermatozoïdes vivants est plus faible que celui des morts et ont atteint les taux les plus bas par rapport aux données bibliographiques, ces derniers montrent que la proportion appropriée de viabilité normale de spermatozoïdes bovins sont ≥ 60 % nous expliquons ces faibles proportions en raison de procédure de congélation /décongélation des paillettes ou les conditions de congélation ou bien les conditions de prélèvement.

I.3. Morphologie

le comptage de spermatozoïdes après la lecture de lames colorées par éosine nigrosine nous a permis de révéler la présence de deux populations de spermatozoïdes normaux et anormaux

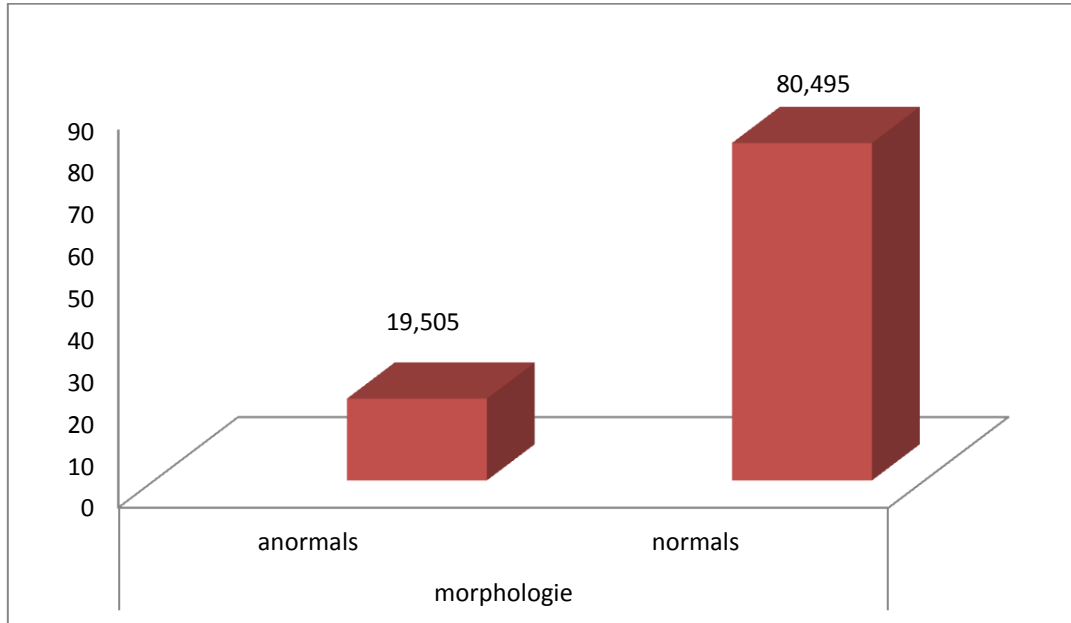


Figure 15 : moyenne de proportion de spermatozoïdes à morphologie normale et anormale analysés par CASA

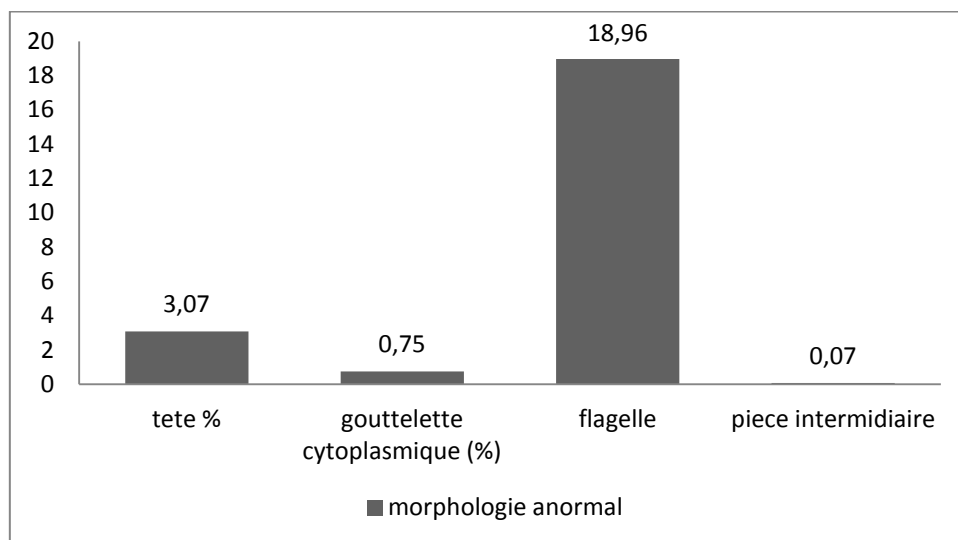


Figure 16 : la moyenne de proportions des anomalies qui touchent les différentes parties du spermatozoïde

Un taux maximal de spermatozoïdes à morphologie anormale est de 80.49 % en retour un taux de spermatozoïdes à morphologie normale est de 19.50 %.

Sur la proportion des spermatozoïdes à morphologie anormale nous avons classé les anomalies qui touchent les différentes parties de spermatozoïde par type (figure 19) et donc nous avons remarqué un pourcentage élevé des anomalies de flagelles 18.96 %, avec 3.07 % pour la tête, et 0.75 % gouttelette cytoplasmique et 0.07 % pour la pièce intermédiaire. Le comptage de ces derniers nous a permis de constater que le pourcentage de spermatozoïdes normaux est bien plus élevé que le taux des spermatozoïdes anormaux .Nous avons constaté aussi que la plupart des anomalies observées concernent les spermatozoïdes dépourvus des flagelles, ceci peut être expliqué par la perte de ces derniers lors de l'étalement du frottis ainsi que l'hypo-osmolarité du colorant peut provoquer la mort ou la lyse de spermatozoïdes.

I.4. La concentration

L'utilisation du CASA pour le calcul de la concentration des échantillons nous a permis d'obtenir des résultats pour chaque taureau, représente dans la figure 19.

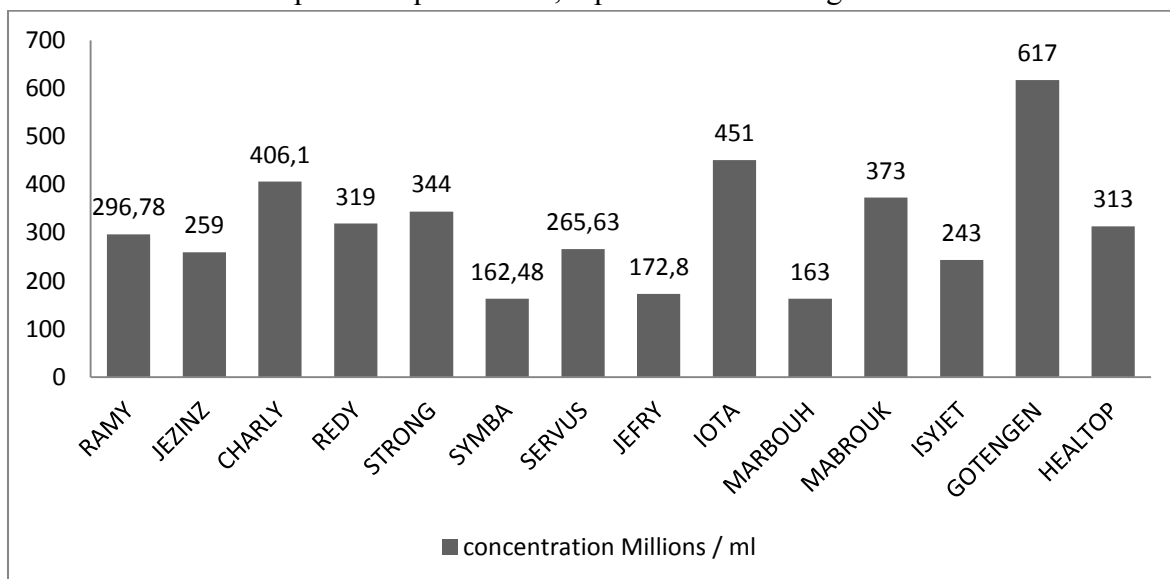


Figure 17 :moyenne de proportion de concentration des spermatozoides pour chaque taureau analysés par CASA

Ces résultats nous ont permis de constater que la majorité des échantillons ont une concentration dans le niveau approprié alors que d'autre qui leur concentration d'un très faible par rapport aux données bibliographique et donc nous pouvons dire que ces échantillons ne se presente du problème de concentration et nous expliquer les échantillons à faible concentration en raison de dilution qui nous avons faites pendant la manipulation sur CASA.

I.5. étude statistique

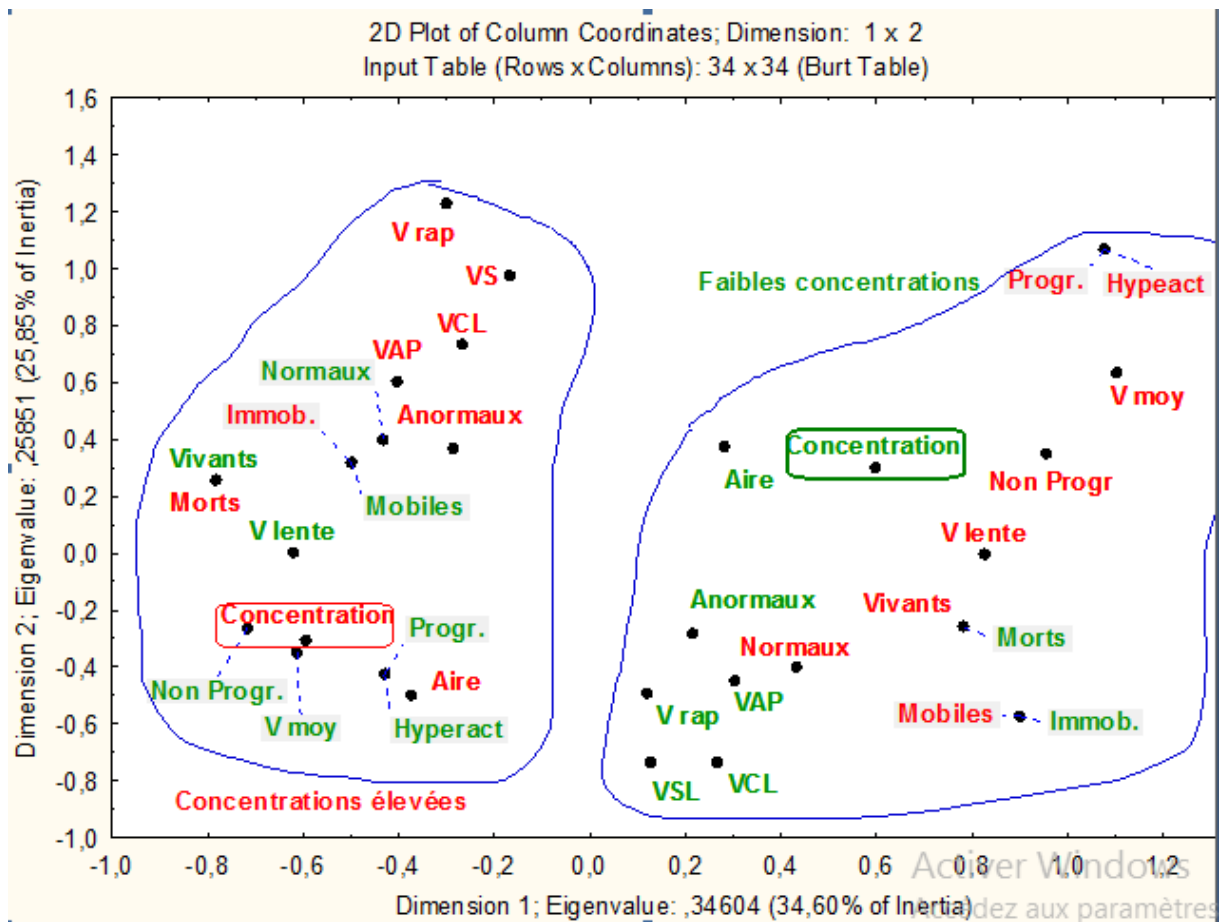


Figure 18 : résultat par ACM de la concordance entre la concentration et les autres paramètres

Des différents paramètres indiquant la caractérisation d'une bonne semence des échantillons se trouve ou la concentration est faible, et de manière relative inversement les échantillons à fortes concentration sont accompagnées par des paramètres d'indice de mauvaise qualité du semence tel que le tableau de statistique nous montre la moyenne de concentration faible des spermatozoïdes de certain échantillon est accompagne par une bonne motilité avec bonne progression et un nombre des spermatozoïdes vivants et en bonne état morphologique. Alors que la moyenne de forte concentration des spermatozoïdes de certain échantillon est accompagnée par une bonne vitesse rapide et une bonne progression avec aire de tête importante.

D'après avoir analysé le tableau de statistique , nous avons constaté que la concentration n'est pas un paramètre tranchant à lui seul.

II. Résultats par cytométrie en flux

II.1. Viabilité

Les résultats obtenus sont sous forme d'un tableau de données avec des graphiques correspondants à chaque échantillon sous forme d'un nuage de points sur lequel deux population peuvent être distinguées : la première, colorée en vert, représente le taux de spermatozoïdes vivants, la seconde, colorée en rouge représente les spermatozoïdes morts. Les graphiques obtenus doivent être traités pour optimiser la précision lors de la lecture.

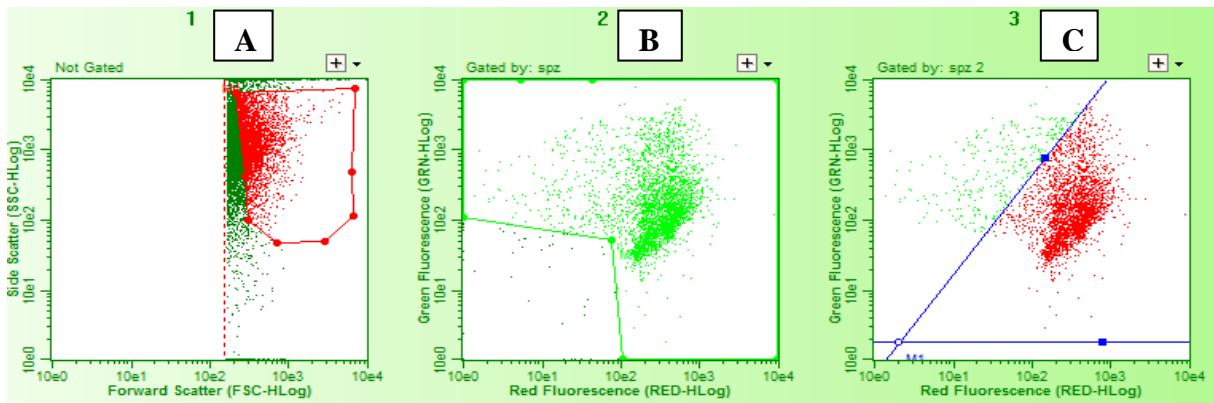


Figure 19 : Résultats du test de viabilité obtenu par le cytomètre en flux, pour un taureau, (A) premier graphique obtenu à l'état brut, (B) traitement du graphique pour éliminer les débris du résultat, (C) résultat final du test ne présentant que les spermatozoïdes vivants (en vert) et les spermatozoïdes morts (en rouge).

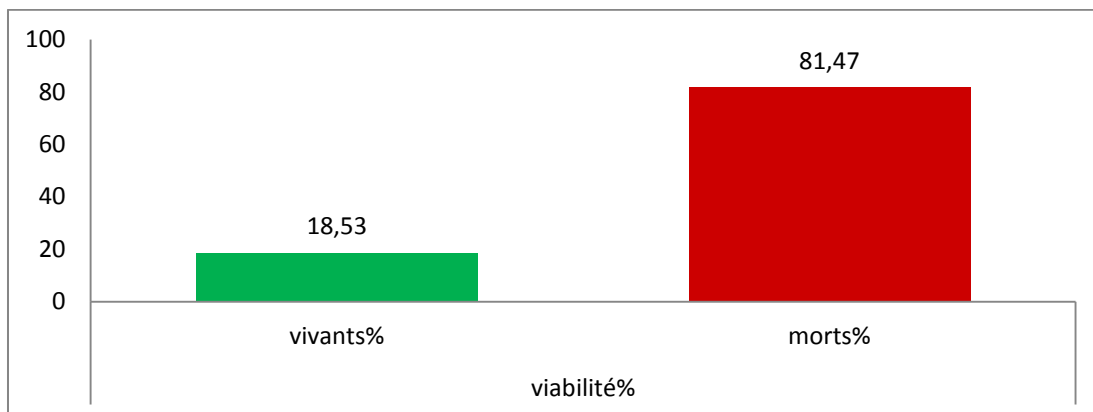


Figure 20 : moyenne de proportion de viabilité des spermatozoïdes analysés par cytomètre en flux.

D'après les données tirées de résultats obtenus, nous avons distinct deux population de spermatozoïdes, la première population en vert représente les spermatozoïdes vivants avec un pourcentage de 18.53% et la deuxième population représente les spermatozoïdes morts avec un pourcentage de 81.47%, Ces résultats nous a permis de constater que le taux de spermatozoïdes vivants est plus faible que celui des morts.

II.2. Concentration

Les résultats de la concentration obtenus sont sous forme d'un tableau de données avec des graphiques correspondants à chaque échantillon sous forme d'un nuage de points sur lequel deux population peuvent être distinguées : la première, colorée en vert, représente les débris, la seconde, colorée en rouge représente le taux de spermatozoïdes. Les graphiques obtenus doivent être traités pour optimiser la précision lors de la lecture.

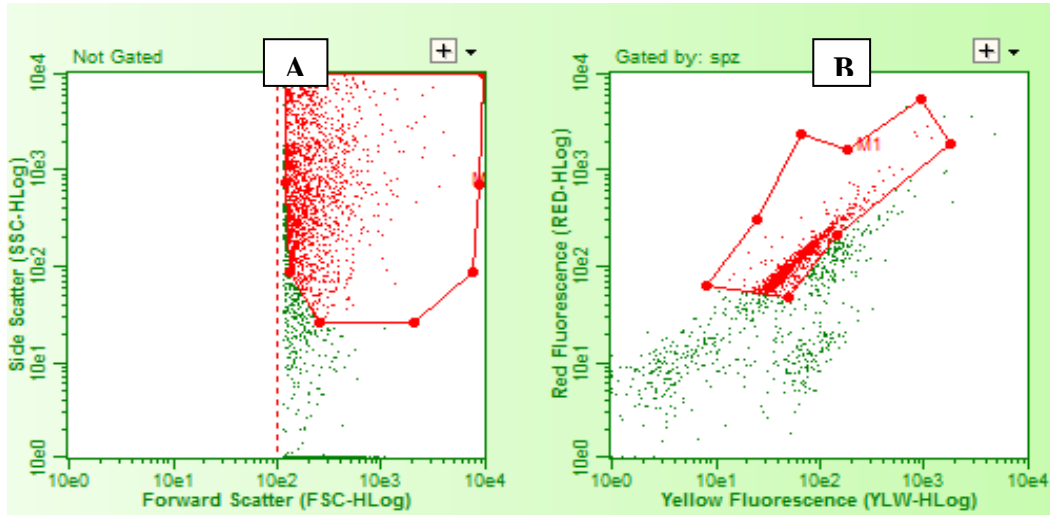


Figure 21: résultats du test de concentration obtenu avec le cytomètre en flux, (A) avant traitement, (B) après traitement.

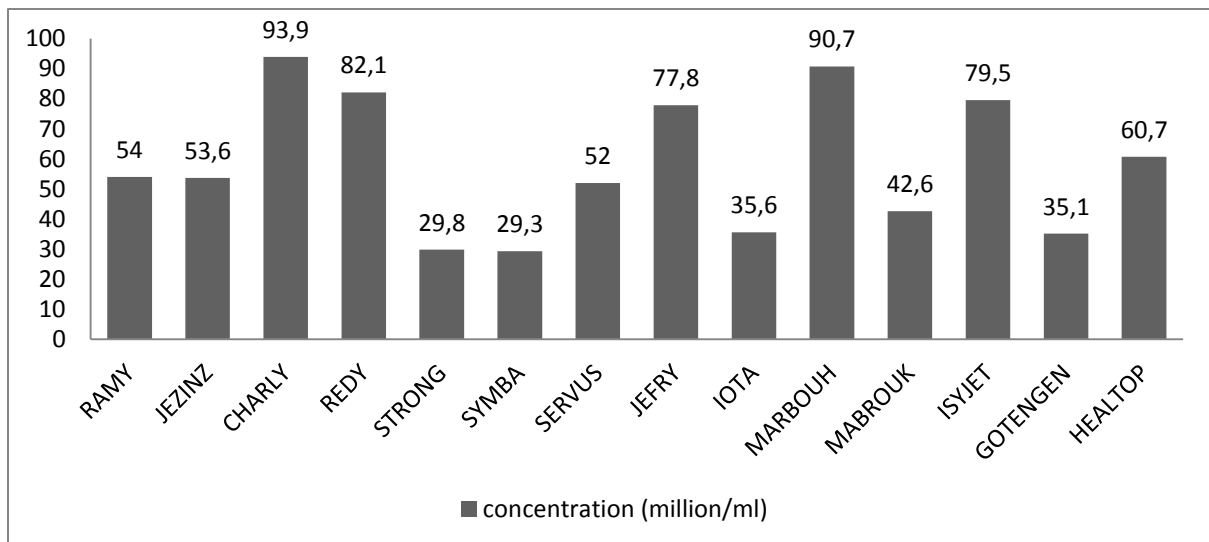


Figure 22 : les proportions de concentration des spermatozoïdes analysés par cytomètre en flux.

Ces résultats nous ont permis de constater que la majorité des échantillons ont une concentration très faible par rapport au niveau approprié avec les données bibliographique et donc nous pouvons dire que ces échantillons se plaignent du problème de concentration et

nous expliquons les échantillons à faible concentration en raison de dilution qui nous avons faites pendant la manipulation sur le cytomètre en flux ou l'effet des réactifs avec la possibilité d'un manque de son activité.

II.3. niveau d'oxydation

Les résultats sont obtenus sous forme d'un tableau des données avec des graphiques sous forme d'un nuage de points sur lequel quatre populations peuvent être distinguées : la première, colorés en vert, représente les spermatozoïdes viables oxydés, la deuxième colorés en noir, représente les spermatozoïdes viables moins oxydés, la troisième colorés en orange, représente les spermatozoïdes morts oxydés, la quatrième coloré en rouge, représente les spermatozoïdes morts et moins oxydés.

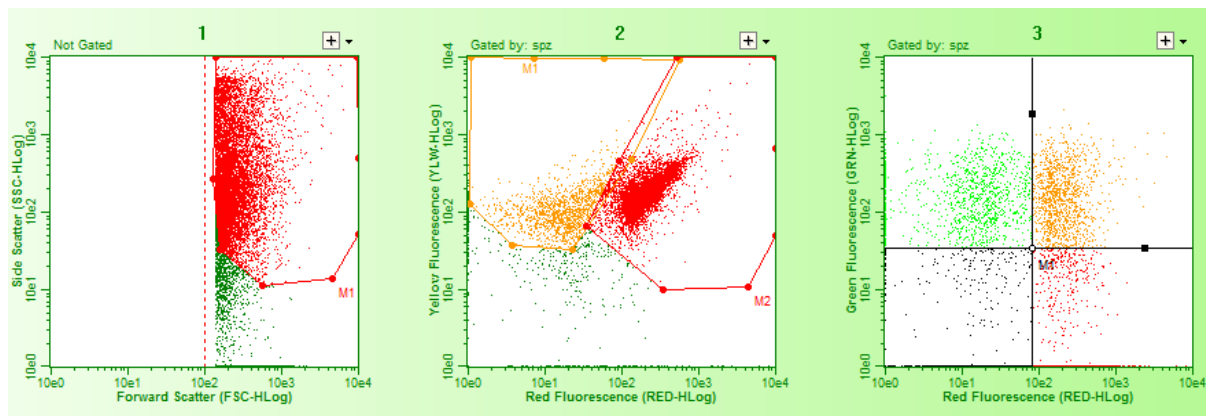


Figure 23 : résultats du test de l'oxydation des spermatozoïdes obtenu par cytomètre en flux.

Le taux élevé d'oxydation de spermatozoïdes est attendu après précédé par l'information disant que la cryoconservation peut être à l'origine de production de radicaux libres et de produit d'oxydation, responsable d'endommagements au niveau de la cellule. Et le taux élevé des spermatozoïdes oxydés morts est probablement relié à l'accélération du vieillissement de spermatozoïde causé habituellement par le phénomène de l'oxydation.

Et il a été prouvé auparavant que « la cryopréservation des spermatozoïdes augmente également la production de dérivés actifs à l'oxygéné (ROS) et réduit ainsi la défense anti-oxydante des spermatozoïdes. (Alvarez et al. 1992. Bilodeau et al. 2002) ».

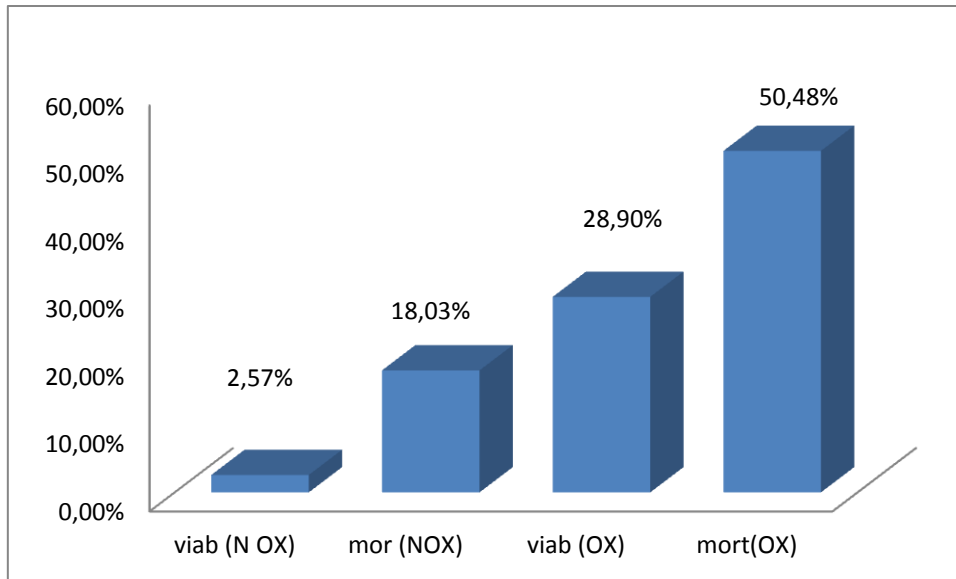


Figure 24 : les proportions de niveau d'oxydation des spermatozoïdes analysés de chaque taureau par cytomètre en flux.

III. Comparaison CASA - Cytométrie en flux

Dans le but de valider les résultats de la cytométrie et de vérifier la complémentarité entre les deux techniques, une comparaison entre les deux méthodes est entreprise.

III.1. La comparaison de concentration par deux techniques CASA et cytométrie en flux :

Tableau V : Tableau comparatif de proportions de concentration par deux méthodes cytométrie en flux et CASA.

	Concentration	
	Cytométrie en flux (millions/ml)	CASA (millions/ml)
RAMY	54	296,78
JEZINA	53,6	259
CHARLY	93,9	406,1
REDY	82,1	319
STRONG	29.8	344
SYMBA	29.3	162,48
SERVUS	52	265,63
JEFRY	77.8	172,8
IOTA	35.6	451
MARBOUH	90.7	163
MABROUK	42.6	373
ISYJET	79.5	243
GOTENGEN	35.1	617
HEALTOP	60.7	313
MOYENNE	67.12	313.27

En raison de l'écart dans les résultats entre la cytométrie en flux et le CASA nous avons opté à accordé une échelle de valeur à des tranches des valeurs des résultats après la calculé de facteur d'écart comme suit :

1/ nous avons calculé la moyen de l'ensemble de concentrations analysées par le CASA 313.27 %

2/ la moyen de l'ensemble de concentrations analysées par la cytométrie en flux 67.12%

3/ nous avons aussi calculé le rapport

La moyenne des concentrations analysées par CASA 313.27 %

La moyenne des concentration analysées par cytométrie en flux 67.12 %

Pour obtenir le facteur de l'écart qui est 5

4/ nous avons exprimé les résultats obtenus sous forme des tranches par catégories comme suit :

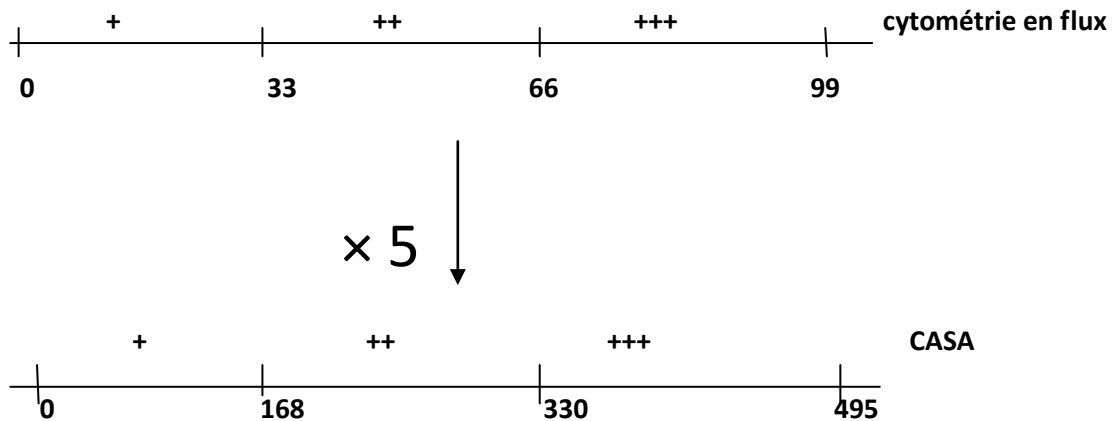


Tableau VI : rapport de trois catégories de la concentration

Echelle de valeurs	Nbr val égales	% sur total (14)
+	1	7%
++	4	29%
+++	2	14%
Somme	7/14	50 %

D'après la comparaison entre la cytométrie en flux et le casa nous avons remarqué que 50% des individus sont présents dans la première catégorie et 57 % dans la deuxième catégorie et 40 % dans la troisième et donc 50 % des individus sont présents dans les mêmes tranches de l'appréciation. Ces résultats nous ont permis de confirmer que les concentrations analysées par le CASA sont supérieures probablement 5 fois à celles qui sont analysées par la cytométrie en flux. Ceci peut être expliqué par le petit volume de semence (2 µl de semence +198 µl de réactif) ou par les conditions de prélèvement.

III.2. La comparaison de viabilité par les deux méthodes

Tableau VII : comparaison de proportion de la viabilité des spermatozoïdes de chaque taureau par les deux méthodes cytométrie en flux et CASA

	Viabilité			
	Cytométrie en flux		CASA	
	Vivants%	Morts%	Vivants%	Morts%
RAMY	8,05	91,95	19,5	80,5
JEZINA	34,49	65,51	23,5	76,5
CHARLY	8,48	91,52	29,5	70,5
REDY	16,7	83,3	8	92
STRONG	11,82	88,18	12	88
SYMBA	11,62	88,3	16,5	83,5
SERVUS	14,13	85,87	8	92
JEFRY	28,28	71,72	12,5	87,5
IOTA	41,85	58,15	20,5	79,5
MARBOUH	38,41	61,59	27	73
MABROUK	11,4	88,6	35	65
ISYJET	16,62	83,38	31,5	68,5
GOTENGEN	6,68	93,32	16,5	83,5
HEALTOP	10,86	89,14	9	91
MOYENNE	18.52	81.46	19.21	80.78

Le pourcentage de viabilité par cytométrie en flux est de 18% et de 19 % par casa. Ces résultats nous ont permis de révéler la fiabilité des deux techniques.

III.3. La comparaison entre la morphologie et le statut oxydatif

Tableau VIII : comparaison entre la morphologie et l'oxydation des spermatozoïdes de chaque taureau.

	Oxydation (% cell oxydée)	Morphologie (%)	
		normal	Anormal
RAMY		86,5	13,5
JEZINZ	41,19	72	28
CHARLY	12,25	80	20
REDY	18,13	73	27
STRONG	25,72	83	17
SYMBA	40,36	54,5	45,5
SERVUS	15,72	74	26
JEFRY	53,4	68,5	31,5
IOTA	18,59	86	14
MARBOUH	42,43	88	12
MABROUK	29,03	66,5	33,5
ISYJET	51,07	89,5	10,5
GOTENGEN	17,62	80	20
HEALTOP	10,25	83,5	16,5

N [OX] N [MF]	46 %
[OX] [MF]	23 %
N [OX] [MF]	23 %
[OX] N [MF]	15 %

N(OX)= non oxydés, N(ML)= non malformations, (OX) = oxydés, (ML)= malformations.

D'après la comparaison nous remarquons que 46 % des spermatozoïdes non oxydés représentent un taux moins faible des anomalies par rapport aux autres spermatozoïdes et 23 % pour les spermatozoïdes oxydés avec des anomalies, et 23 % des non oxydés avec des anomalies, et 15 % pour les spermatozoïdes oxydés avec taux faible des anomalies.

Ces résultats nous ont permis de constater que L'oxydation est probablement en forte relation avec la malformation des spermatozoïdes ce qui en faveur de la complémentarité entre les deux technique CASA et la cytométrie en flux.

Conclusion

Ce travail traite de l'importance de disposer de techniques analytiques fiables permettant d'évaluer la semence bovine. L'objectif était d'évaluer les deux méthodes d'analyse, le CASA et la cytométrie en flux, et d'évaluer une éventuelle complémentarité entre les deux.

Les paramètres abordés sont la concentration, mobilité, viabilité, morphologie et le niveau d'oxydation. La semence bovine est utilisée après décongélation.

L'étude du sperme par CASA a montré l'exactitude et la précision atteintes par cette méthode. Une étude statistique par analyse de correspondances multiples a révélé que la concentration en spermatozoïdes ne serait pas un indicateur de qualité du sperme à elle seule. La considération des autres paramètres peut révéler une bonne qualité d'un sperme à faible concentration en spermatozoïdes et inversement.

Les résultats du cytomètre, malgré leur dépassement de date de validité, ont donné satisfaction vu leur rapprochement à ceux du CASA. Nous avons réalisé finalement qu'il existe une concordance entre certains résultats comme la viabilité, la concentration, la morphologie et ceux de l'oxydation entre CASA et Cytométrie en flux.

Il est possible de déclarer qu'une complémentarité entre les deux techniques CASA et Cytométrie se serait affirmée, donc toute la recommandation serait d'inciter à associer la cytométrie en flux et CASA pour une meilleure précision de caractérisation de la qualité spermatique.

En perspectives il est vivement recommander de continuer l'étude pour apporter plus de confirmations à ces résultats en appliquant les deux méthodes sur un nombre important de taureaux. Il serait judicieux de reprendre l'étude sur les appareils CASA et Cytomètre de dernière génération, particulièrement avec l'avènement de ce derniers dans le laboratoire de biotechnologie de la reproduction animale au niveau de l'ISV de l'université de Blida.

*Références
bibliographiques*

1. Agarwal, A., Makker, K., Sharma, R. (2008). Clinical relevance of oxidative stress in male factor infertility: an update. *American journal of reproductive immunology*, 59(1), 2-11.
2. Aitken, R. J. (1989). The role of free oxygen radicals and sperm function. *International journal of andrology*, 12(2), 95-97.
3. Alvarez JG, (1992). Storey BT. Evidence for increased lipid peroxidative damage and loss of superoxide dismutase activity as a mode of sublethal cryodamage to human sperm during cryopréservation. *journal of andrology*. 13:232-41.
4. Amann RP, Hammerstedt RH. (1993). In vitro evaluation of sperm quality: an opinion. *journal of andrology*, 14:397-406.
5. AMANN RP. (2004). Reflections on CASA after 25 years. *Journal of andrology*, 25(3): 317-325.
6. BARONE, R., (2001). Anatomie comparée des mammifères domestique Vol 4, splanchnologie II, 3ème édition Edition Paris, France, 896 p.
7. Baumber, J., Ball, B.A., Gravance, C.G., Medina, V., & Davies-Morel, M.C. (2000). The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrosomal integrity, mitochondrial membrane potential, and membrane lipid peroxidation. *Journal of andrology*, 21(6), 895-902.
8. Bilodeau JF, Blanchette S, Cormier N, Sirard MA. (2002). Reactive oxygen species-mediated loss of bovine sperm motility in egg yolk Tris extender: protection by pyruvate, metal chelators and bovine liver or oviductal fluid catalase. *Theriogenology*, 57:1105-22.
9. Bilodeau JF, Chatterjee S, Sirard MA, Gagnon C., (2000). Levels of antioxidant defenses are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. *Mol Reprod*, 55:282-8.
10. Bonnes G, Desclauze J. (2005). Reproduction des animaux d'élevage. 2nd ed. *Educagri, editor*.
11. Briand-amirat L., Anton M., Gerard O. et Tainturier D. (2006). *Revue Méd. Vét.*, 4 : 205-212.
12. Brouwers, J.F., & Gadella, B.M. (2003). In situ detection and localization of lipid peroxidation in individual bovine sperm cells. *Free radical biology & medicine*, 35(11), 1382-1391.

13. Buhr MM, Canvin AT, Bailey JL., (1989). Effects of semen preservation on boar spermatozoa head membranes. *Gamete Res.*; **23**:441-9.
14. Cabannes CR. (2008). Comparaison des méthodes d'évaluation de la qualité de la semence dans les espèces bovine, canine et humaine. *Thèse du doctorat vétérinaire. Université Paul-sabatier. Toulouse.*
15. Calamera, JC., Fernandez, P J., Buffone, MG., Acosta, AA., & Doncel, GF. (2001). Effects of longterm in vitro incubation of human spermatozoa: functional parameters and catalase effect. *Andrologia*, **33**(2), 79---86.
16. Charles T, Levasseur MC. (2001). La reproduction chez les mammifères et l'homme. *Coédition INRAEllipses.*: 756–289.
17. CHENOWETH, P.J. (2007). Clinical Reproductive Anatomy and Physiology of the bull – In : ROBERT, S. YOUNGQUIST., WALTER, R. THREFALL – Current Therapy in large animal *theriogenology, second edition – Saunders Elsevier*, p 217.
18. Clarke RN, Johnson LA. (1997). Effect of liquid storage and cryopréservation of boar spermatozoa on acrosomal integrity and the penetration of zona-free hamster ova in vitro. *Gamete Res.*; **16**:193-204.
19. Cordelli E, Eleuteri P, Leter G, Rescia M, Spano M. (2005). Flow cytometry applications in the evaluation of sperm quality: semen analysis, sperm function and DNA integrity. *Contraception*; **72**:273-9.
20. Cormier N, Sirard MA, Bailey JL. (1997). Premature capacitation of bovine spermatozoa is initiated by cryopréservation. *Journal of andrology*; **18**:461-8.
21. Cupps PT., (1991). Reproduction in domestic animals., Fourth edition SanDiego. academic press, p670.
22. Curry MR. (2000). Cryopréservation of semen from domestic livestock. *Rev Reprod*; **5**:46-52.
23. Dacheux F, Dacheux JL. (2001). La reproduction chez les mammifères et l'homme. *In: INRA-Ellipses C, editor. La Reprod chez les mammifères l'homme; p. 290–315.*
24. Dominguez-Rebolledo, A.E., Fernandez-Santos, M. R., Bisbal, A., Ros-Santaella, J. L., Ramon, M., Carmona, M., Garde, J. J. (2010). Improving the effect of incubation and oxidative stress on thawed spermatozoa from red deer by using different antioxidant treatments. *Reproduction, fertility, and development*, **22**(5), 856-870

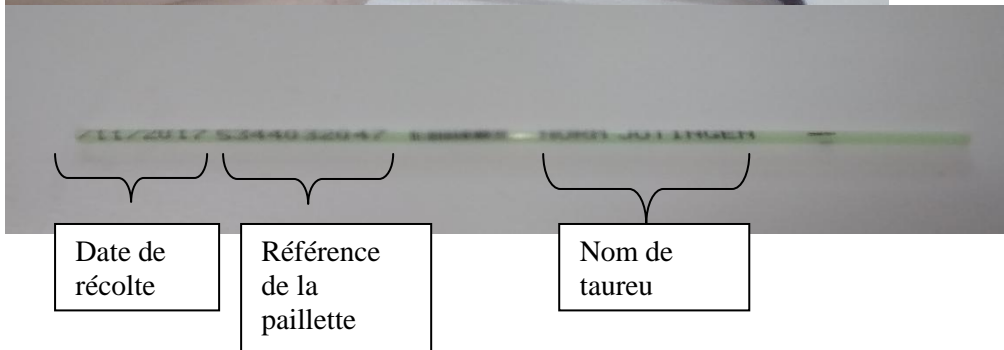
25. DRION, J.P., BECKERS, J.F., DERIVAUX, J. et ECTORS, F., (1993). Physiologie de la reproduction. *Ed. Gallimard, 152 p.*
26. EDUCAGRI, (2005). Reproduction des animaux d'élevage. *Educagri Edition, Dijon, France 407 p.*
27. Eustache, F., Jouannet, P., & Auger, J. (2001). Evaluation of flow cytometric method to measure human sperm concentration. *Journal of andrology*, 22(4) :588-567.
28. GERARD, O., KHIRREDINE., B. (2002). Production de semence bovine. *Didacticiel de Maîtrise de la reproduction des bovins*, 73 p.
29. Gillan L, Evans G, Maxwell WM. (2005). Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. *Theriogenology*, **63**:445-57.
30. Graham , JK, Moce E. (2005). Fertility evaluation of freeze-thaw semen. *Theriogenology.*;**64**:492-504.
31. Graham, JK., Kunze, E. et Hammerstedt, RH., (1990). Analysis of sperm cell viability, acrosomal integrity, and mitochondrial function using flow cytometry. *Biol. Reprod.*, 43 :55-64.
32. HAZEN, C. (2009-2010). Rappels anatomophysiologiques relatifs à la reproduction du taureau. *ORBI. Université de Liège, 8 P.*
33. Hebert A, Bovins LESS. (2011). Caractérisation de l'activité phosphodiesterase chez les spermatozoïdes bovins. *Département des Sciences Animales ,faculté des sciences de l'agriculture et de l'alimentation université laval québec* :162
34. HOCHEREAU, M.T. (1964). Durée de la spermatogénèse chez le taureau : étude par autoradiographie testiculaire. *5th. Int. Congr. Anim. Reprod. Artif. Insem.* **3** :541.
35. Holt WV, Van Look KJ. (2004). Concepts in sperm heterogeneity, sperm selection and sperm competition as biological foundations for laboratory tests of semen quality. *Reproduction.* **127**:527-35.
36. Howard JG, Bush M, de Vos V, Schiewe MC, Pursel VG, Wildt DE. (1986). Influence of cryoprotective diluent on post-thaw viability and acrosomal integrity of spermatozoa of the African elephant (*Loxodonta africana*). *J Reprod Fertil.* **78**:295-306.
37. Januskauskas A, Johannisson A, Soderquist L, Rodriguez-Martinez H.(200). Assessment of sperm characteristics post-thaw and response to calcium ionophore in relation to fertility in Swedish dairy AI bulls. *Theriogenology.* **53**:859-75.

38. kabera F. (2008). Appreciation de la qualité de la semence bovine produite au centre national d'amélioration génétique (CNAG) de Dahra au Sénégal. *Mémoire de diplôme d'études approfondies de productions animales. Ecole inter-états des science et medecine vétérinaires de Dakar.*
39. Kim, SH., Yu, DH., & Kim, YJ. (2010). Apoptosis-like change, ROS, and DNA status in cryopreserved canine sperm recovered by glass wool filtration and Percoll gradient centrifugation techniques. *Animal reproduction science*, *119*(1-2), 106-114.
40. Konfe H. (2014). Etude spermologique des bovins de races locales de l'Afrique de l'Ouest : cas du Borgou , du taurin Lagunaire , du taurin N'Dama et du Zébu Peulh. *Université polytechnique de Bobo-Dioulasso:87.*
41. Koppers, AJ., De Iuliis, GN., Finnie, JM., McLaughlin, EA., & Aitken, RJ. (2008). Significance of mitochondrial reactive oxygen species in the generation of oxidative stress in spermatozoa. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, *93*(8), 3199-3207.
42. Laghrour W. (2012). Comparaison de deux méthodes de traitement de Maitrise des cycles associant la progesterone oeustrogènes et la prostaglandine f2atpha chez la vache laitière. *Thèse de magister. Université el-hadj lakhdar Batna.*
43. LePec JB., Paoletti C. (1967). A fluorescent complex between ethidium bromide and nucleic acids. Physical-chemical characterization. *J Mol Biol.*,*27* :87-106.
44. Marc S. (2015). Actualités en cryoconservation des semences des principales espèces d'intérêt vétérinaire. Lyon:163.
45. Martinez-Pastor, F., Aisen, E., Fernandez-Santos, M. R., Estes, M.C., Maroto-Morales, A., Garcia-Alvarez, O., & Garde, J.J. (2009). Reactive oxygen species generators affect quality parameters and apoptosis markers differently in red deer spermatozoa. *Reproduction*, *137*(2), 225-35. doi: 10.1530/REP-08-0357
46. Moce E, Graham JK. (2008). In vitro evaluation of sperm quality. *Anim Reprod Sci.* **105**:104-18.
47. Neild, D.M., Gadella, B.M., Chaves, MG., Miragaya, M.H., Colenbrander, B., & Agüero, A. (2003). Membrane changes during different stages of a freeze-thaw protocol for equine semen cryopreservation. *Theriogenology*, *59*(8), 1693-1705.
48. Oflaherty C, Beconi M, Beorlegui N. (1997). Effect of natural antioxidants, superoxide dismutase and hydrogen peroxide on capacitation of frozen-thawed bull spermatozoa. *Andrologia.* **29**:269-75.

49. Ollero M, Perez-Pe R, Muino-Blanco T, Cebrian-Perez JA. (1998). Improvement of ram sperm cryopreservation protocols assessed by sperm quality parameters and heterogeneity analysis. *Cryobiology*. **37**:1-12.
50. Petrunkina AM, Volker G, Brandt H, Topfer-Petersen E, Waberski D. (2005). Functional significance of responsiveness to capacitating conditions in boar spermatozoa. *Theriogenology*. **64**:1766-82.
51. Pons-Rejraji H, Bailey JL, Leclerc P. (2009). Cryopreservation affects bovine sperm intracellular parameters associated with capacitation and acrosome exocytosis. *Reprod Fertil Dev*. **21**:525-37.
52. Ponsart C., Marqant Leguienne B., Humblot P. (2004). 11^{ème} Rencontre Recherche Ruminants. *Paris*. 361-368.
53. Ponthier J. (2012). Pathologie de la Reproduction des Animaux de Compagnie et Equidés, *Clinique des Animaux de Compagnie et des Equidés*:9.
54. Purdy PH , Graham JK, (2004). Effect of adding cholesterol to bull sperm membranes on sperm capacitation , the acrosome reaction , and fertility. *biolReprod* **71** : 522-527.
55. Rigal GBF. (2008). Comparaison de la qualité de la semence de taureaux collectes à l'électroéjaculateur ou au vagin artificiel. *Thèse du doctorat. Université Paul-sabatier. Toulouse*.
56. Rodriguez-Martinez H. (2006). Can we increase the estimated value of semen assessment? *Reprod Domest Anim*. **41** Suppl 2:2-10.
57. Rodriguez-Martinez H. (2007). State of the art in farm animal sperm evaluation. *Reprod Fertil Dev*. **19**:91-101.
58. Ronot, X., Grunwald, D., Mayol, J.F., & Boutonnant, J. (2006). *La cytométrie en Flux*.
59. Rukundo J. (2009). Evaluation des résultats de l'insémination artificielle bovine dans le département de Mbour au Sénégal : cas de projet Goana. *Thèse de doctorat. Université cheikh anta diop de dakar*.
60. Salamon S, Maxwell WMC. (1995). Frozen storage of ram semen I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. *Animal Reproduction Science*. **37**:pp. 185-249.
61. Salson OG. (2008). Récolte et conservation du sperme chez les félins : *étude bibliographique. [place unknown]: Lyon:201*

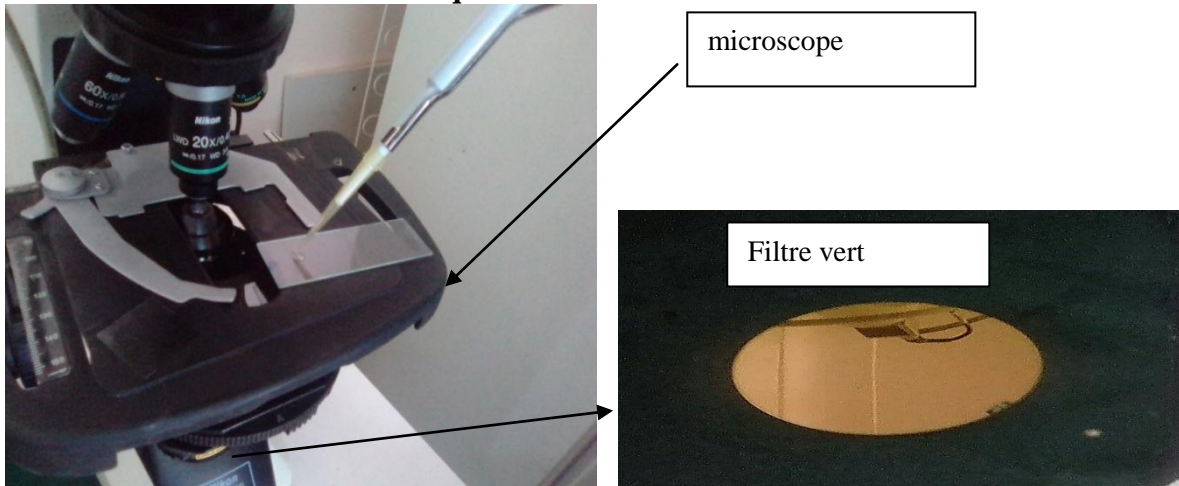
62. SETCHELL, BP. (1991). Male Reproductive Organs and semen. In : CUPPS, PT. *Reproduction in domestic Animals - 4ème édition. San Diego: Academic Press*, 221-249.
63. Shannon P, Vishwanath R. (1995). The effect of optimal and suboptimal concentrations of sperm on the fertility of fresh and frozen bovine sperm and a theoretical model to explain the fertility differences. *Anim Reprod Sci* **39**:1-10.
64. Shapiro, H. M. (2005). Frontmatter, in *Practical Flow Cytometry, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA*.
65. THIBIER, M., (1977). La fonction sexuelle du jeune taurillon (Bos taurus). *Thèse de Doctorat et Sciences, Paris, France, 100 p*.
66. Watson PF. (1981). The roles of lipid and protein in the protection of ram spermatozoa at 5 degrees C by egg-yolk lipoprotein. *J Reprod Fertil.* **62**:483-92.
67. Zielonka, J., Hardy, M., & Kalyanaraman, B. (2009). HPLC study of oxidation products of hydroethidine in chemical and biological systems: ramifications in superoxide measurements. *Free radical biology & medicine*, **46**(3), 329-338. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2008.10.031.

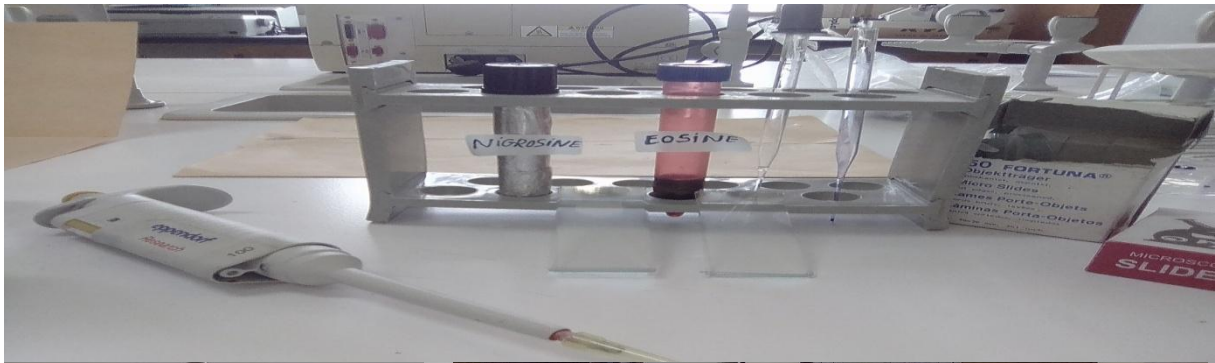
Annexe



Photos indique le BT de l'azote liquide dans lequel les paillettes sont congelés.

Matériels utilisés dans la technique CASA :

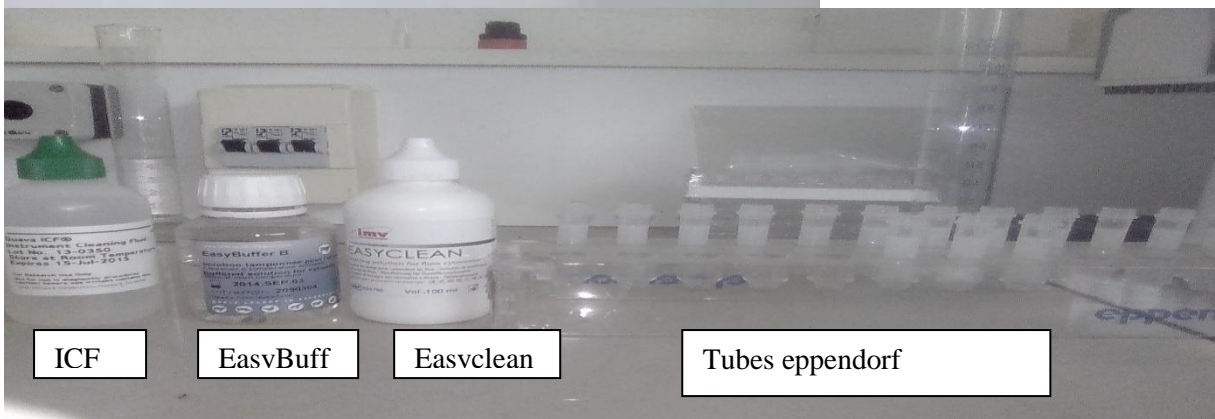




Matériels utilisés dans la méthode de cytométrie en flux



Easykit : la plaque de microcupules contenant les réactifs



ICF

EasvBuff

Easvclean

Tubes eppendorf

La méthode de test de motilité par CASA

a) Le réchauffement du la semence:



b) diluée dans un tube eppendorf à l'ordre d'un V : V



c) Dépôt de 10 microlitres sur une lame de verre l'on recouvrira, par dépôt horizontal, avec une lamelle de verre



d) Observation de mouvement des spermatozoides



Activer Windows

La méthode de test de viabilité par CASA

on dépose sur une lame:



10µl de la semence diluée à 1/9



ajoute 10µl de l'éosine



10µl de nigrosine



Etaler et laisser sécher 2 à 3 minutes



la lecture se fait au microscope SCA® au grossissement 20x

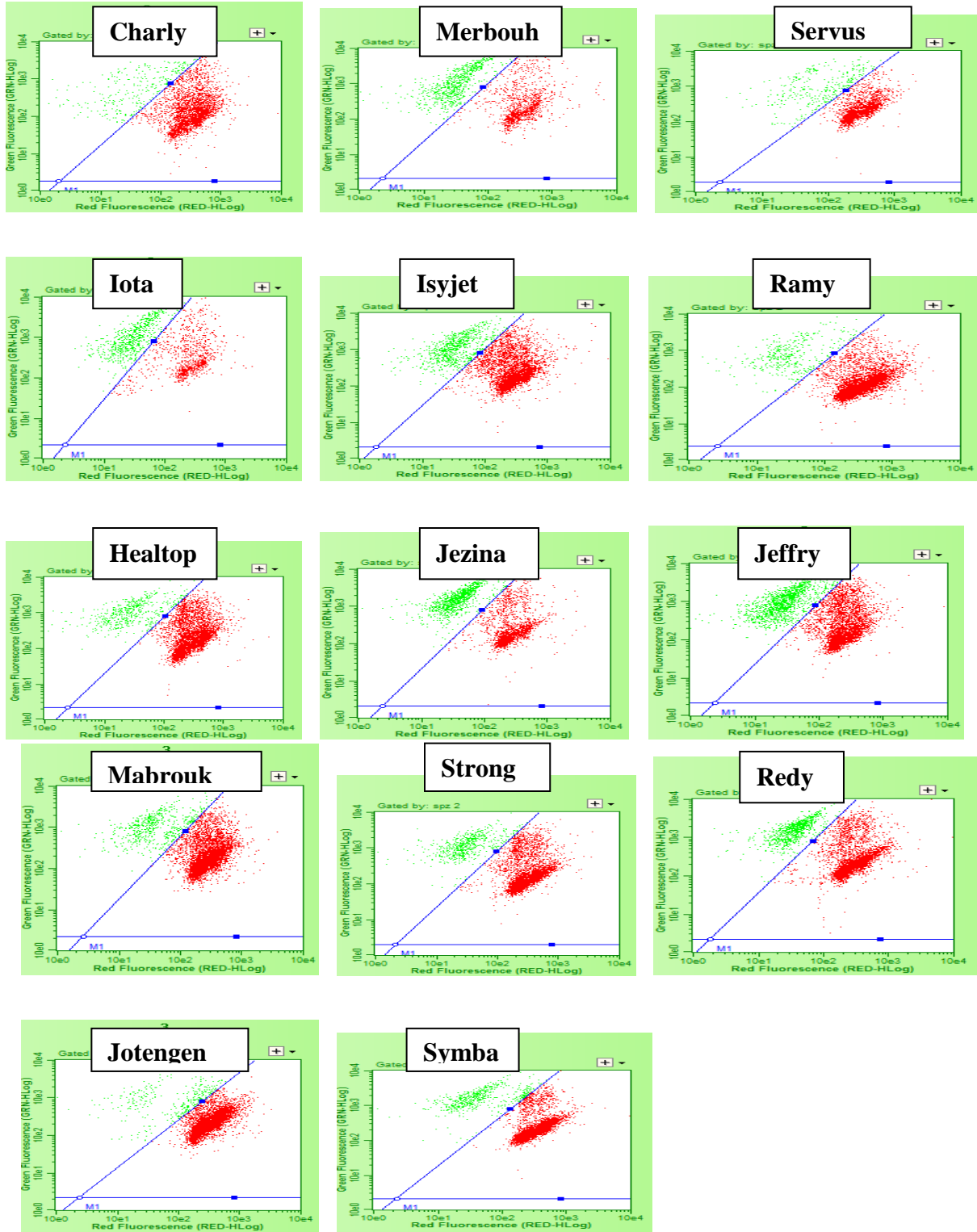
Activer Windows

le lavage de la cytométrie en flux

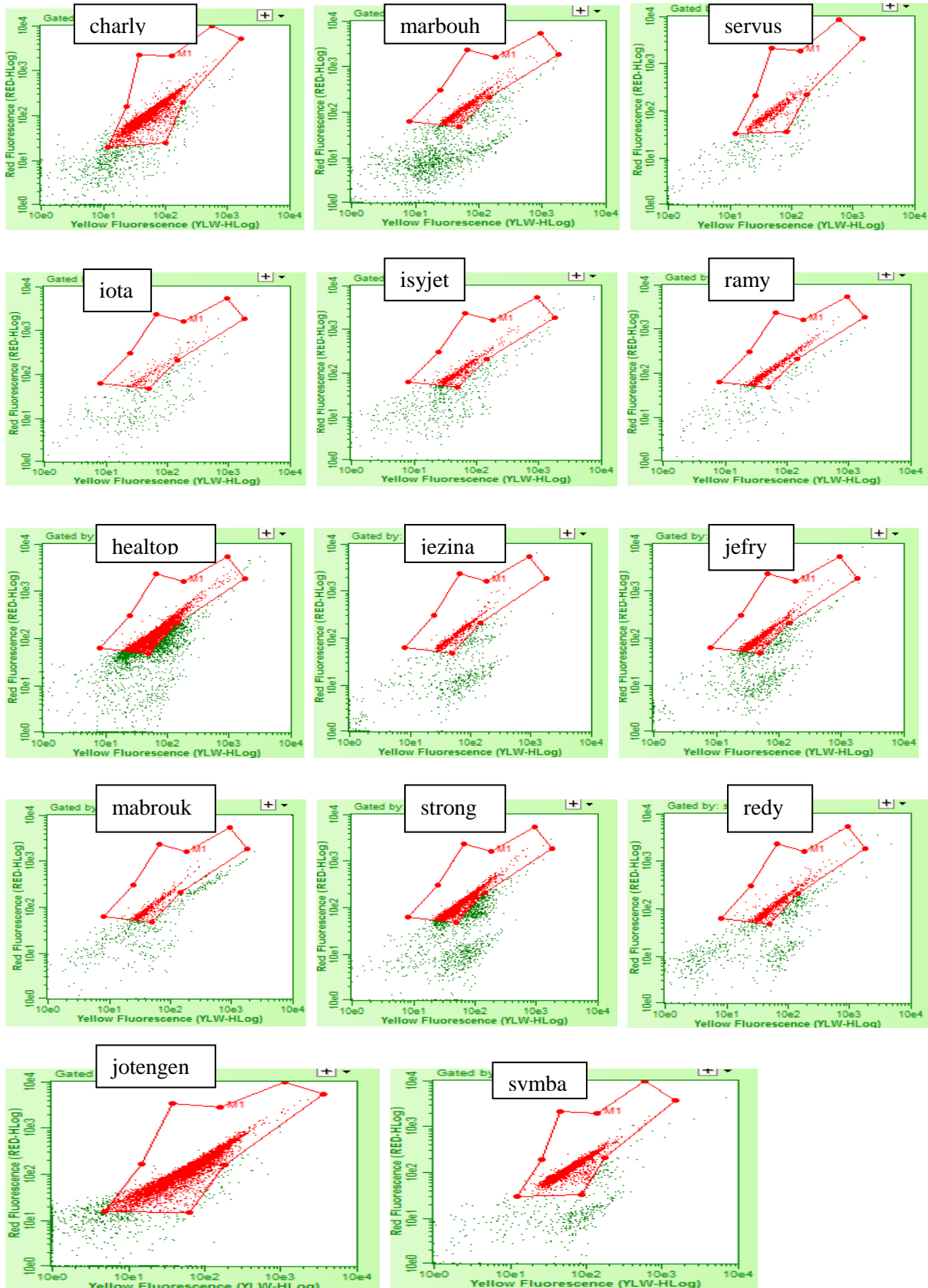
- remplir des tubes de 1,5 ml dans w1, w2, w3, w4, w5, w6 et dans la position 1 du tube avec de l'eau distillée
- remplir un tube de 1,5 ml avec 100 ul d'eau de Javel et placez-le dans la position du tube 2
- remplir des tubes de 1,5 ml dans les positions 3 et 4 du tube avec ICF
- remplir un autre tube de 1,5 ml avec de l'eau distillée et le placer dans la position d'arrêt capillaire désirée (positions du tube 5-9)
- indique la position d'arrêt capillaire sur la carte du bac vers la droite



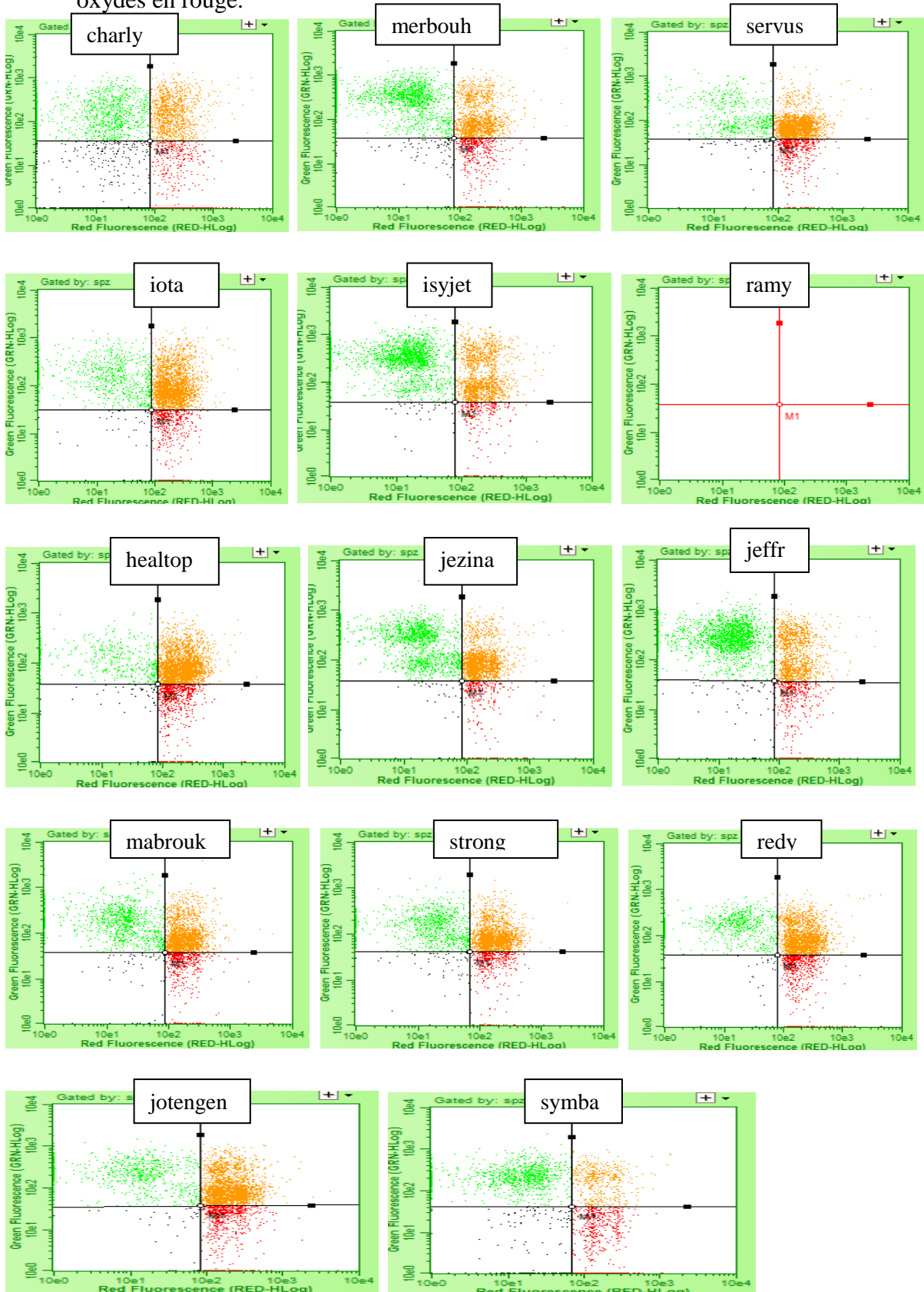
1. Résultats du test de viabilité obtenu par le cytomètre en flux, le résultat final du test ne présentant que les spermatozoïdes vivants (en vert) et les spermatozoïdes morts (en rouge).

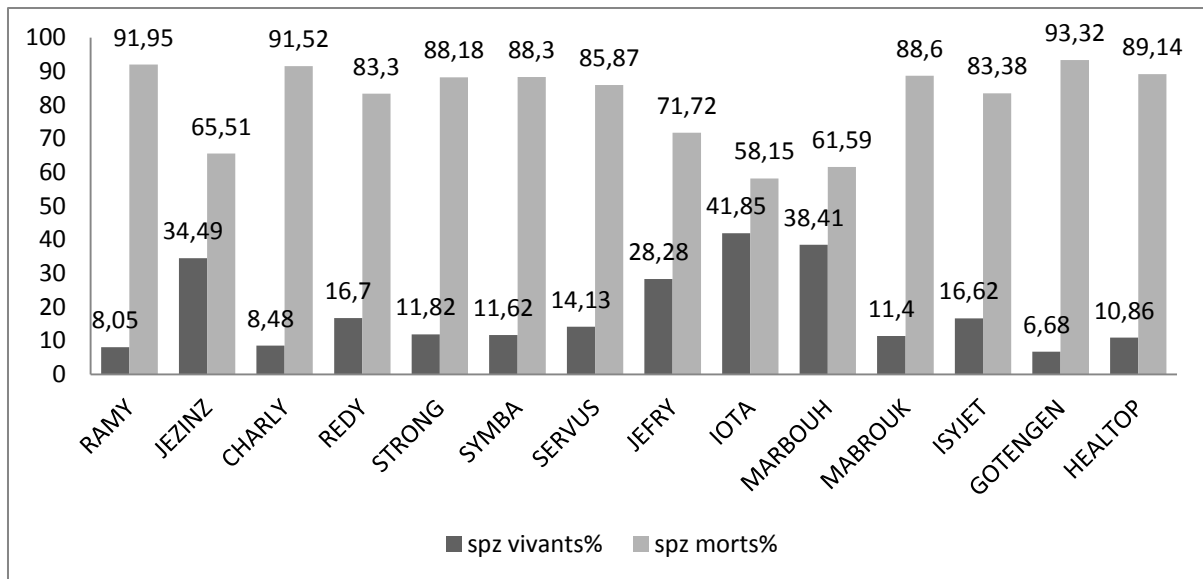


2. Résultats du test de concentration obtenu par le cytomètre en flux, deux populations peuvent être distinguées ; la première colorée en vert représente les débris, la deuxième colorée en rouge représente le taux de spermatozoïdes.

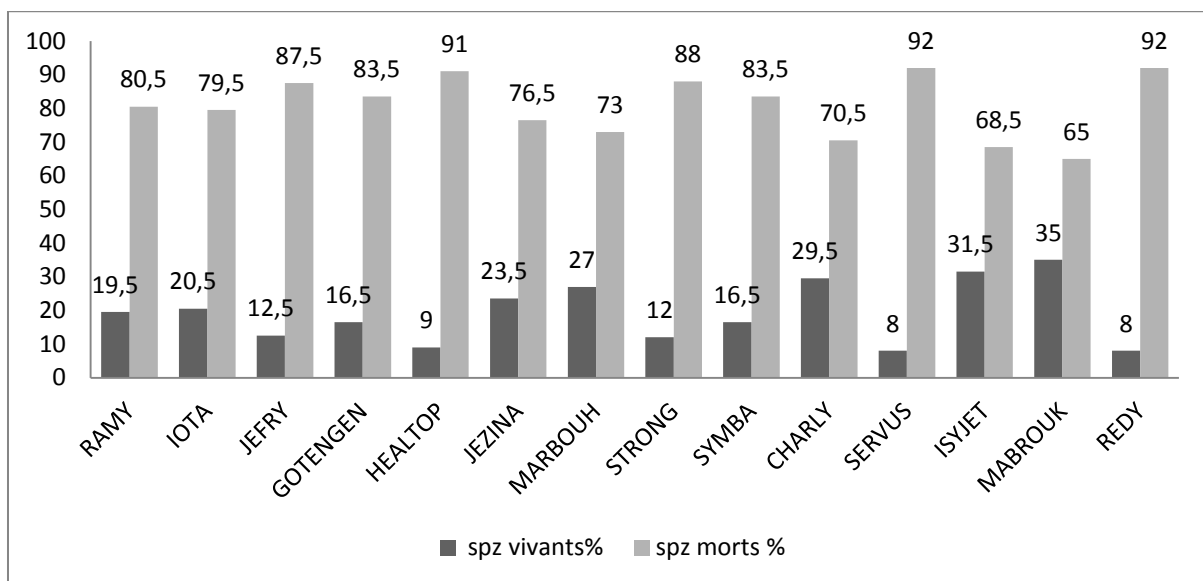


3. Résultats du test de statut d'oxydation obtenu par le cytomètre en flux, quatre populations peuvent être distinguées, les spz viables oxydés colorés en vert, les spz viables moins oxydés en noir, les spz morts oxydés en orange, les spz morts moins oxydés en rouge.

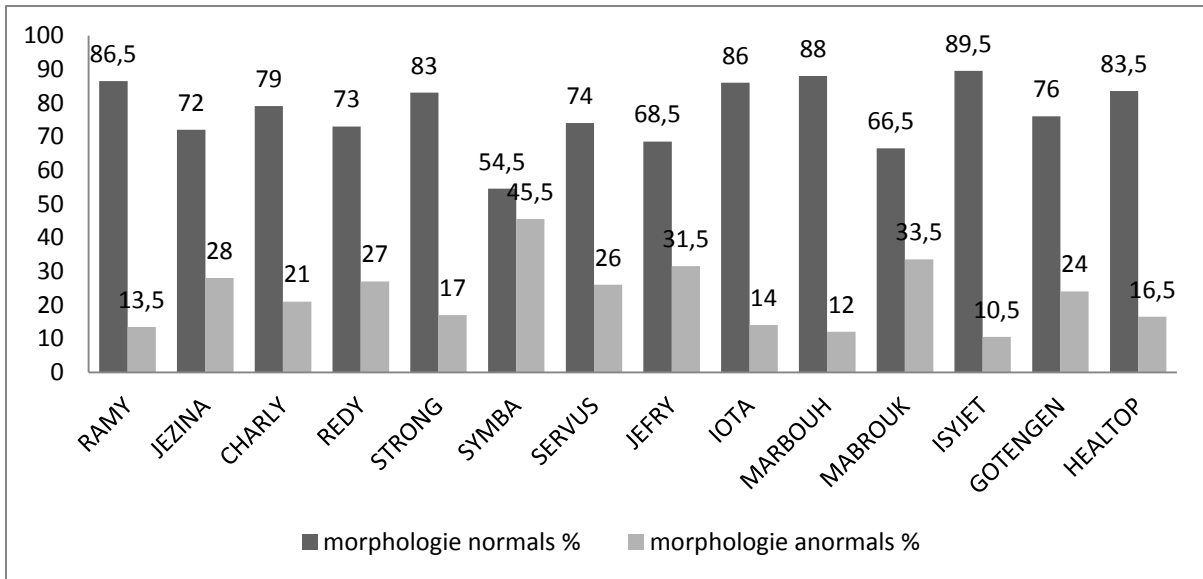




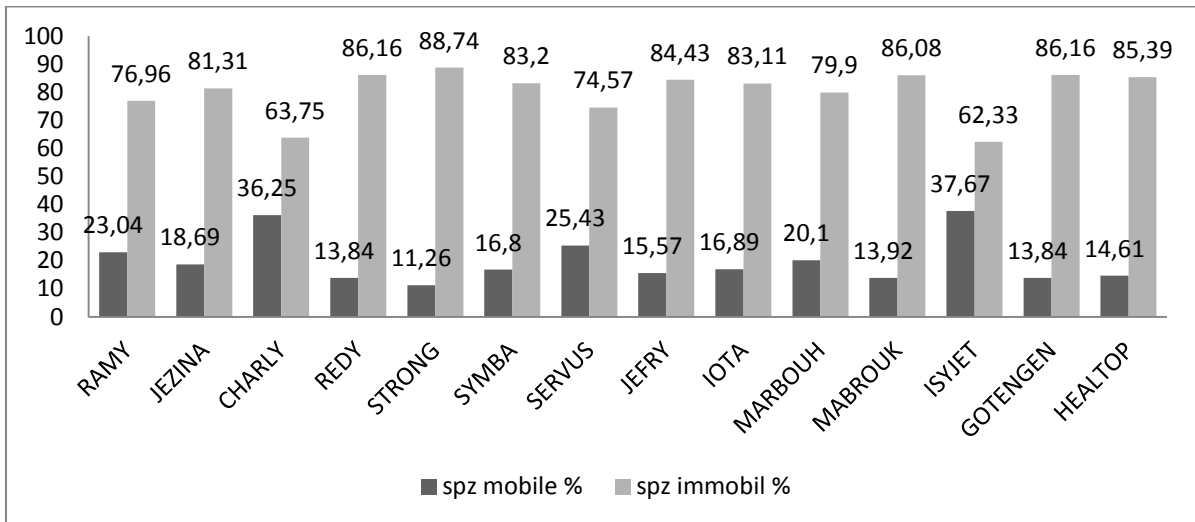
Les résultats de test de viabilité obtenu par cytométrie en flux pour chaque taureau



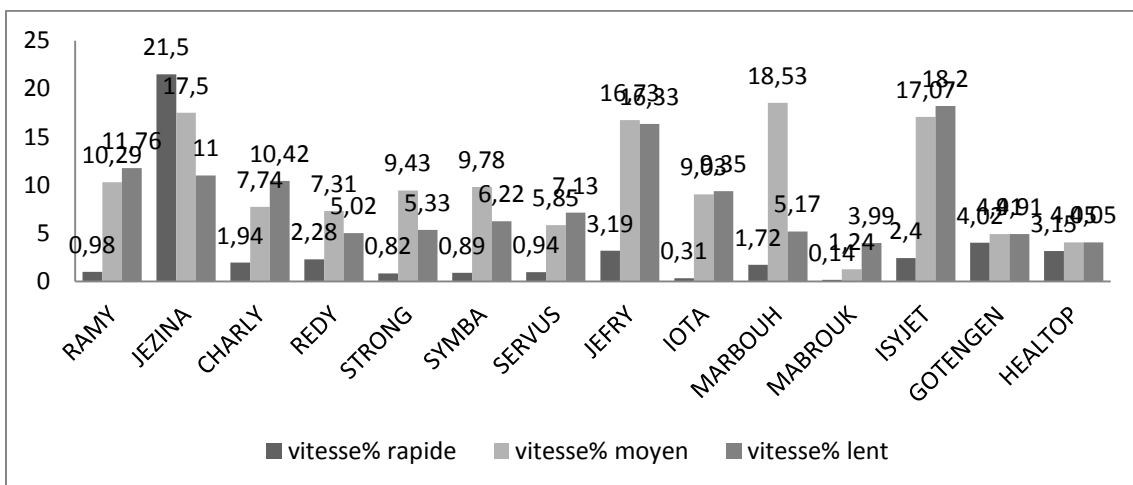
Les résultats de test de viabilité obtenu par CASA pour chaque taureau



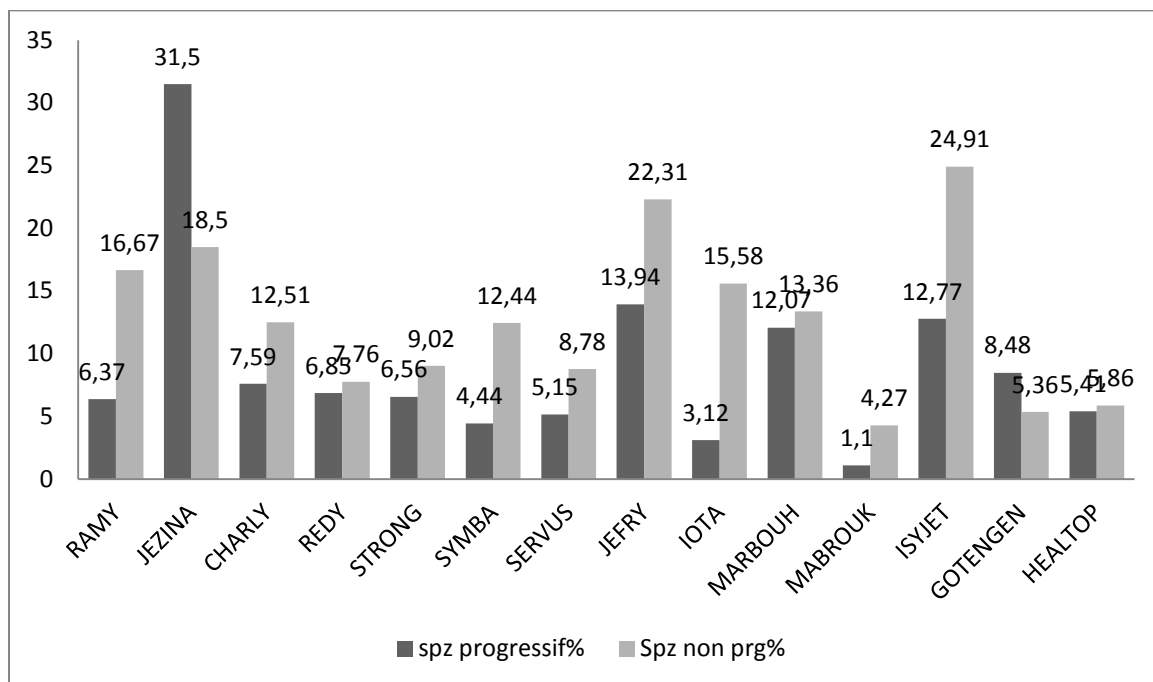
Les résultats de test de morphologie obtenus par CASA pour chaque taureau



Les résultats de test de mobilité obtenu par CASA pour chaque taureau



Les résultats de la vitesse obtenue par CASA pour chaque taureau



Les résultats de la progression obtenu par CASA pour chaque taureau

Résumé

Le succès de l'insémination artificielle chez les bovins dépend la qualité de la semence, et pour garantir une semence de bonne qualité dans laquelle les spermatozoïdes sont en bon état de vitalité et en nombre suffisant tout en maintenant leur pouvoir fécondant, il existe des tests et des analyses de l'échantillon par différentes techniques. Dans cette étude nous avons proposé d'étudier quelques paramètres permettant l'évaluation de la qualité des semences bovines de 14 taureaux, en utilisant deux méthodes différentes : CASA et cytométrie en flux. la concentration, la viabilité, la motilité, et la morphologie ont été évalués par la méthode CASA, et la concentration, la viabilité, et l'oxydation ont été évalués par la méthode cytométrie en flux. ensuite nous avons comparé entre les résultats de la concentration obtenues par CASA et les résultats de la concentration obtenues par cytométrie en flux, et également pour les résultats de la viabilité. Nous avons comparé aussi la morphologie des spermatozoïdes avec l'oxydation et extraire le lien entre les deux. Il ressort de cette étude que le processus congélation/décongélation des semences affecte sur la motilité et la viabilité des spermatozoïdes significativement et donc diminuer la qualité des semences.

Mots clé : semence bovine, spermatozoides, congélation-décongélation, CASA, cytométrie en flux.

Summary

The success of artificial insemination in cattle depends on the quality of the semen, and to ensure a good quality semen in which the sperm are in good vital condition and in sufficient numbers while maintaining their fertilizing power, there are tests and analyzes of the samples by different techniques. In this study we proposed to study some parameters allowing the evaluation of the quality of the bovine semen of 14 bulls, using two different methods: CASA and flow cytometer. concentration, viability, motility, and morphology were assessed by the CASA method, and the concentration, viability, and oxidation were evaluated by the flow cytometry method. then we compared CASA concentration results with concentration results obtained by flow cytometry, and also for the results of viability. We also compared the morphology of spermatozoa with oxidation and extract the link between the two. It appears from this study that semen freezing-thawd affects the motility and viability of spermatozoa significantly and therefore decreases seed quality.

Key words : bovine semen, spermatozoa, freezing-thawd , CASA, flow cytometry.

