

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique



Institut des Sciences
Vétérinaires- Blida

Université Saad
Dahlab-Blida 1-



Projet de fin d'études en vue de l'obtention du

Diplôme de Docteur Vétérinaire

Essai de simplification du test de gonflement hypo-osmotique (HOST) sur sperme canin : Réduction du temps d'incubation.

Présenté par

EL HADJ TAHAR Nabil

GUECHTOULI Mustapha

Devant le jury :

Président(e) :	YAHIMI k	M.C.B	ISV. Blida
Examineur :	ADEL D	MAA	ISV. Blida
Promoteur :	BELLALA, R	MCB	ISV. Blida

Année : 2016/2017

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail à :

Mes parents.

Pour leur soutien inconditionnel et leur bienveillance
Toute ma reconnaissance et mon amour

Mes frères :

Islem , Ramzi, Naim

Ma sœur:

Farah

Mes Oncles:

Krimo, Mohammed, Mohammed, Mahmoud, et Salim

Mes amis et compagnons d'études :

Abderrahim, Yasser, Kamel, Tarek, Walid, Youcef, Ayoub,
Oussama, Aymen, Abderrahman, Bilel.
Pour tous ces moments inoubliables !!

Mustapha et toute sa Famille

Mes amis de la faculté et tous les étudiants de la Promo
2016/2017

EL HADJ TAHAR Mohamed Nabil

Dédicaces

A mes parents,

A Mes Freres,

A toute ma famille.

A mes amis,

A BILEL,

A Nabil et sa famille.

Mustapha GUECHTOULI

REMERCIEMENT

A Monsieur R.BELALA, qui fut à l'origine de ce travail ,qui a bien voulu accepter la responsabilité de nous guider, pour sa confiance, pour ces conseils et sa sympathie.

Hommage respectueux

A Monsieur A.k.YAHIMI, qui a bien voulu accepter de présider l'examination de notre mémoire.

Hommage respectueux

A Monsieur D.ADEL, qui a bien voulu accepter d'examiner notre mémoire.

Hommage respectueux

Au Biologistes Khadidja, Assia, Wahiba, et Chrifa, Pour leur disponibilité, leur sourire, et leur Aide au cours précieuse au cours de ce travaille .

Sincères Remerciement

ملخص

في عام 1984 قام الباحث (Jeyendran وآخرون) بعمل اول محاولة لتجربة انتفاخ الغشاء الهولي للامشاج على امشاج الانسان من أجل تقييم وظيفة غشاء الهولي للامشاج

في عام 1993، قام ENGLAND و PLUMMER بهذا الاختبار على الحيوانات المنوية للكلاب بنجاح التي يقوم بوضع الحيوانات المنوية لمدة 60 دقيقة عند 37 درجة مئوية في محلول أسموليته 100mOsmol (بروتوكول مرجعي).

و مع هذا، وقت الاختبار و اعداد المحاليل في مخبر شكلوا عائقا عمليا حال دون ادماج هذا الاختبار في تحليل السائل المنوي الروتيني.

و يهدف عملنا لتخفيف وقت التجربة و ذلك بتغيير أسمولية المحاليل (50mOsmol, 00mOsmol) و وقت الانتظار (0، 15، 30، 45، 60 د)

لهذا، جمعنا ثلاثة عشر (13) سائل منوي من 5 كلاب بالغين من مختلف السلالات ذوي صحة جيدة وخصوبة مؤكدة.

نتائجنا تشير إلى أن فترة الاختبار يمكن تخفيضها إلى 30 دقيقة في محلول 50mOsmol من دون فرق مع البروتوكول المرجعي .

الكلمات المفتاح: كلب، الامشاج، الحركية، وظيفة اغشية الخلايا المنوية، الحيوية، خاصية التنقل.

RESUME

En 1984, JEYENDRAN et ses collaborateurs ont mis en évidence pour la première fois le test de gonflement hypo-Osmotique (HOS_t) du spermatozoïde humain afin d'évaluer l'intégrité et la fonctionnalité de la membrane plasmique flagellaire.

En 1993, ENGLAND et PLUMMER ont adapté ce test avec succès au sperme canin en faisant incuber les spermatozoïdes pendant 60mn à 37°C dans une solution de 100mOsmol (Protocole de référence).

Cependant, ce temps d'incubation ainsi que la préparation au laboratoire d'une solution hypo-osmotique ont constitué une contrainte pratique ayant empêché d'intégrer ce test dans le spermogramme de routine.

Notre travail a pour objectif de réduire la durée d'incubation du test en faisant varier simultanément les deux paramètres étudiés à savoir le temps d'incubation (0mn, 15mn, 30mn, 45mn, 60mn) ainsi que l'osmolarité de la solution hypo-osmotique (00mOsmol, 50mOsmol, 100mOsmol, 150mOsmol).

Pour cela, nous avons collecté treize (13) éjaculats à partir de 5 chiens adultes de diverses races, en bonne santé et de fertilité confirmée.

Nos résultats suggèrent que le temps d'incubation pourrait être réduit à 30 min dans une solution de 50mOsmol sans différence avec le protocole de référence.

Mots Clés : Chien, Semence, Motilité, intégrité membranaire, HOS-Test, Morphologie, Vitalité.

Summary

In 1984, JEYENDRAN and colleagues demonstrated for the first time the hypo-osmotic swelling test(HOS_t) of human spermatozoa in order to evaluate the integrity and functionality of the flagellar plasma membrane.

In 1993, ENGLAND and PLUMMER successfully adapted this test to canine semen by incubating the spermatozoa for 60 minutes at 37 ° C in a 100mOsmol solution (Reference Protocol).

However, this incubation time as well as the laboratory preparation of a hypo-osmotic solution constituted a practical constraint which prevented the integration of this test into the routine spermogram.

Our objective is to reduce the incubation time of the test by simultaneously varying the two parameters studied, namely the incubation time (0mn, 15min, 30min, 45min, 60min) as well as the osmolarity of the hypo- Osmotic solution (50mOsmol, 100mOsmol, 150mOsmol).

For this, we collected thirteen (13) ejaculates from 5 adult dogs of various breeds, in good health and confirmed fertility.

Our results suggest that the incubation time could be reduced to 30 min in a 50mOsmol solution without difference with the reference protocol.

Key Words: Dog, Seed, Motility, Membrane Integrity, HOS-Test, Morphology, Vitality.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION.....	9
I. L'APPAREIL GENITAL MALE	12
A. Les testicules et les voies spermatiques.	12
B. Le pénis.	13
C. Les glandes annexes.	13
II. LA SEMENCE CANINE	14
A. Caractéristiques générales de la semence canine.....	15
B. Composition de la semence canine.....	16
C. Récolte de la semence canine.....	17
D. Evaluation de la semence canine.....	20
1. Les examens utilisés en routine.	20
2. Les examens réalisables en seconde intention.	23
III. LE TESTE HYPO-OSMOTIQUE.....	23
A. Principe.....	23
B. Méthode.....	23
C. Comparaison de différentes méthodes.....	26
ETUDE EXPERIMENTALE	27
I. MATERIEL ET METHODE.....	29
A. Animaux.....	29
B. Méthode de récolte.....	29
C. Evaluation initiale de la semence.....	29
D. LE TEST HYPO-OSMOTIQUE : (L'intégrité membranaire).....	30
1. Préparation des Solutions Hypo-Osmotique.....	30
2. Préparation et lecture des lames de frottis-HOST	31
II. RESULTATS.....	32
A. Caractéristiques de la semence fraîche.....	32
B. Résultats des tests HYPO-OSMOTIQUES.....	32
III. DISCUSSION.....	41
A. Influence des deux facteurs.....	41
B. Le Duo Optimale des deux facteurs.....	42
C. Autocritique de notre travail.....	42
Conclusion.....	43
Bibliographie.....	44
TABLE DES ILLUSTRATIONS.....	46

INTRODUCTION

La semence canine est constituée des spermatozoïdes, produits par les testicules au cours de la spermatogenèse, et du liquide séminal, produit par les glandes annexes.

Les spermatozoïdes sont des cellules hautement spécialisées dont la fonction première est la fécondation de l'ovocyte dans le tractus génital femelle. Ils sont produits en grande quantité mais plusieurs anomalies fonctionnelles et structurelles peuvent être à l'origine d'une diminution de la fertilité de la semence.

L'évaluation de la semence est donc une étape importante pour apprécier sa qualité avant **l'insémination artificielle** et aussi avant sa **conservation** (réfrigération et congélation). Cette évaluation se fait habituellement par une batterie de tests (spermogramme de routine) pour savoir si la semence est fécondante à l'état frais et si elle est conservable et fécondante après réanimation.

Le spermogramme de routine comprend l'évaluation de la mobilité massale et individuelle (observation entre lame et lamelle sur platine chauffante), de la vitalité (coloration à l'éosine-nigrosine) ainsi que la concentration spermatique (numération). Il peut s'étendre à un **spermocytogramme** qui est l'évaluation des anomalies morphologiques des spermatozoïdes.

Le test de gonflement Hypo-Osmotique (HOST) consiste à faire incuber le sperme dans un milieu hypo-osmotique à 37°C pendant un certain temps et à observer (sur frottis) et quantifier les spermatozoïdes qui ont réagi par gonflement et incurvation de leurs flagelles et ceux qui sont restés non réactionnels. La réaction de gonflement du flagelle est due au phénomène d'osmose qui permet l'entrée de l'eau depuis le milieu hypo-osmotique vers le milieu interne du flagelle et témoigne ainsi de son intégrité membranaire et sa fonctionnalité. L'absence de réaction indique un flagelle non fonctionnel.

Ce test a été mis en évidence la première fois en 1984 par JEYENDRAN et ses collaborateurs sur le sperme humain afin d'évaluer l'intégrité et la fonctionnalité de la membrane plasmique flagellaire

En 1993, ENGLAND et PLUMMER ont adapté ce test avec succès au sperme canin en faisant incuber les spermatozoïdes pendant 60mn à 37°C dans une solution hypo-osmotique de 100mOsmol préparée au laboratoire à base de fructose et de citrates de sodium (Protocole de référence).

Le HOST revêt un intérêt capital dans l'évaluation de la fertilité *in vitro* notamment qu'il renseigne sur l'intégrité fonctionnelle du flagelle contrairement à la coloration vitale (éosine-nigrosine) qui est un test plutôt structural. Cependant le temps d'incubation d'une heure et la préparation au laboratoire d'une solution hypo-osmotique ont constitué une contrainte pratique. En situation clinique, le praticien qui s'apprête à réaliser une IA ou à récolter et évaluer le sperme en vue de l'expédier (IA différée ou banque de sperme) ne dispose généralement pas des

moyens et du temps nécessaires pour réaliser le HOSt dans le cadre d'un spermogramme de routine.

Notre objectif est d'essayer de simplifier ce test de manière à permettre de l'intégrer dans le spermogramme rapide. Pour cela nous allons comparer simultanément plusieurs durées d'incubation (0mn, 15mn, 30mn, 45mn, 60mn) et plusieurs osmolarité de la solution hypo-osmotique (0mOsmol, 50mOsmol, 100mOsmol, 150mOsmol) à la recherche du meilleur couple « temps d'incubation-osmolarité » qui puisse donner le même résultat que le protocole de référence décrit par ENGLAND et PLUMMER en 1993.

Dans une première partie, nous ferons quelques rappels sur l'anatomie et la physiologie de l'appareil génital mâle ; puis dans une deuxième partie, nous nous intéresserons à la semence canine en insistant sur sa composition, sa récolte et son évaluation ; enfin en troisième partie, nous nous pencherons sur Le Test de Gonflement Hypo-Osmotique.

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

I. L'APPAREIL GENITAL MALE

A. Les testicules et les voies spermatiques.

1. Rappels anatomiques :

Les testicules sont des organes pairs mesurant trois à quatre centimètres de longueur sur trois centimètres de largeur et pesant une vingtaine de grammes chez un chien de grande race. Leur taille est proportionnelle au poids du chien. Les testicules ont une forme globuleuse, presque sphérique. Ils sont situés en région périnéale basse dans le scrotum. (Barone, 1978 ; Collin, 2003)

Les testicules sont constitués d'un parenchyme testiculaire parcouru par une structure fibreuse appelée l'albuginée et sont entourés d'une séreuse. Le parenchyme testiculaire se divise en lobules au sein desquels cheminent les tubes séminifères, lieu d'**élaboration des gamètes mâles**. Les tubes séminifères convergent pour donner le *rete testis*. Entre les tubes séminifères, se trouve le tissu interstitiel. Le rete testis forme des canalicules efférents qui aboutissent au 20 niveau de la tête de l'épididyme. Le canal déférent prolonge l'épididyme et rejoint l'urètre au niveau du col de la vessie. L'urètre s'abouche au niveau du gland du pénis. L'urètre présente donc une double fonction chez le mâle : **l'excrétion urinaire et l'éjaculation**. (Collin, 2003 ; Barone, 1978).

2. Rôles des testicules.

a) La sécrétion d'hormones.

Les cellules de Leydig situées dans le tissu interstitiel des testicules sécrètent la **testostérone** et des hormones androgéniques (Fontbonne et al., 2000 ; Reece 1997). La testostérone joue un rôle dans le bon déroulement de la spermatogenèse. Elle intervient également sur le développement structurel et sur le fonctionnement physiologique des glandes sexuelles accessoires. Enfin, elle joue sur le développement des caractères sexuels secondaires et sur le développement et le maintien de la libido. (Johnston et al., 2001a ; Reece, 1997)

Les cellules de Sertoli situées dans la paroi des tubes séminifères sécrètent de nombreuses hormones dont l'activine, l'inhibine et l'oestradiol ainsi que plus d'une soixantaine de protéines. De plus, elles protègent, nourrissent et servent de support aux cellules souches. (Johnston et al., 2001a ; Fontbonne, 1992)

b) La spermatogenèse

La spermatogenèse est la production des gamètes mâles : les **spermatozoïdes**. La durée de la spermatogenèse n'est pas clairement établie ; elle varie de soixante-trois à soixante-dix jours suivant les auteurs (Fontbonne et al., 2000). La quantité de spermatozoïdes produits est proportionnelle à la taille du chien ; elle varie de deux cents millions à plus de deux milliards de spermatozoïdes par éjaculat (Fontbonne, 1992).

La spermatogenèse se déroule au sein de la paroi des tubes séminifères en deux étapes successives : **la spermatocytogenèse**, méiose qui permet de passer du stade spermatogonie au stade spermatide et **la spermiogenèse** qui permet la différenciation des spermatides en spermatozoïdes (figure n°2). Les spermatozoïdes sont finalement libérés dans la lumière des tubes séminifères au cours de la spermiation. Les spermatogonies souches se renouvellent par mitose. Les spermatozoïdes immatures libérés dans la lumière des tubes séminifères rejoignent l'épididyme au niveau duquel ils vont acquérir leur mobilité et leur aptitude à féconder au cours de deux processus distincts : c'est la **maturation épидидymaire** qui s'effectue sous contrôle androgénique. Au cours de cette maturation épидидymaire, le noyau des spermatozoïdes subit une condensation

importante et de nombreuses modifications lipidiques et protéiques intéressent la membrane plasmique. La grande majorité des spermatozoïdes (70 %) sont ensuite stockés dans la queue de l'épididyme (Reece, 1997). Après une abstinence prolongée, la qualité de la semence peut être altérée du fait d'une surmaturation épидидymaire. (Fontbonne, 1992 ; Johnston et al. 2001a)

B. Le pénis.

1. Rappels anatomiques.

La longueur moyenne du pénis varie de six à vingt-cinq centimètres selon la taille du chien. Le pénis est composé de trois parties : **la racine** et **le corps** qui sont les éléments fixes du pénis et **le gland** qui constitue sa partie libre. En dehors de l'érection, le pénis est totalement recouvert par une enveloppe cutanée : le prépuce (Barone, 1978 ; Collin, 2003). La racine est constituée des corps caverneux, tissu peu érectile qui s'ossifie pour devenir l'os pénien dans la partie libre du pénis et qui permet la pénétration de la femelle lorsque l'érection n'est pas maximale (Collin, 2003 ; Johnston et al. 2001a). Le gland du pénis est divisé en deux parties, une partie allongée crânialement et une partie renflée caudale : **le bulbe érectile**. Le bulbe érectile génère de nombreux influx nerveux ; c'est cette zone qui doit être stimulée lors de la masturbation. Le gland est constitué du corps spongieux qui est un tissu érectile. Il faut noter la présence du muscle rétracteur du pénis qui intervient en fin d'érection pour ramener le pénis en position de repos. (Collin, 2003) **La vascularisation** du pénis provient de l'artère du pénis. Cette artère donne de nombreuses artères qui cheminent au sein du pénis. Les artères sont flexueuses ; cette forme leur permet de s'adapter au changement de taille du pénis lors de l'érection. De nombreuses veines collectent le sang et se rejoignent pour finalement donner les veines du pénis qui rejoignent la veine honteuse interne. (Barone, 1978)

L'innervation du pénis est double :

- une innervation parasympathique via le nerf honteux qui donne le nerf dorsal du pénis. Ce nerf est sensitif ;
- une innervation sympathique via le nerf hypogastrique. Ce nerf donne des fibres intervenant dans l'érection, dans la motricité des vaisseaux et dans la régulation des sécrétions prostatiques. (Barone, 1978 ; Collin, 2003)

C. Les glandes annexes.

1. La prostate.

La prostate est une **glande** située en position rétro-péritonéale. Elle enserre l'urètre au niveau du col de la vessie. Elle est constituée d'un corps bilobé et d'une partie disséminée. Le corps de la prostate mesure deux à trois centimètres chez un chien de taille et d'âge moyen. (Collin, 2003) Cette glande joue un rôle primordial dans l'élaboration du sperme. **Les sécrétions prostatiques** représentent les trois quarts du volume spermatique. Les rôles de ces sécrétions sont multiples : effet tampon contre le pH vaginal, action bactériostatique, participation à la fin de la maturation des spermatozoïdes, propriétés immunosuppressives dirigées contre les éléments du tractus génital femelle. (Fontbonne, 1992, Johnston et al., 2001a)

2. Les glandes préputiales.

Ces glandes sébacées situées à la base du gland joueraient un rôle lubrifiant et sécrèteraient des phéromones. (Fontbonne, 1992)

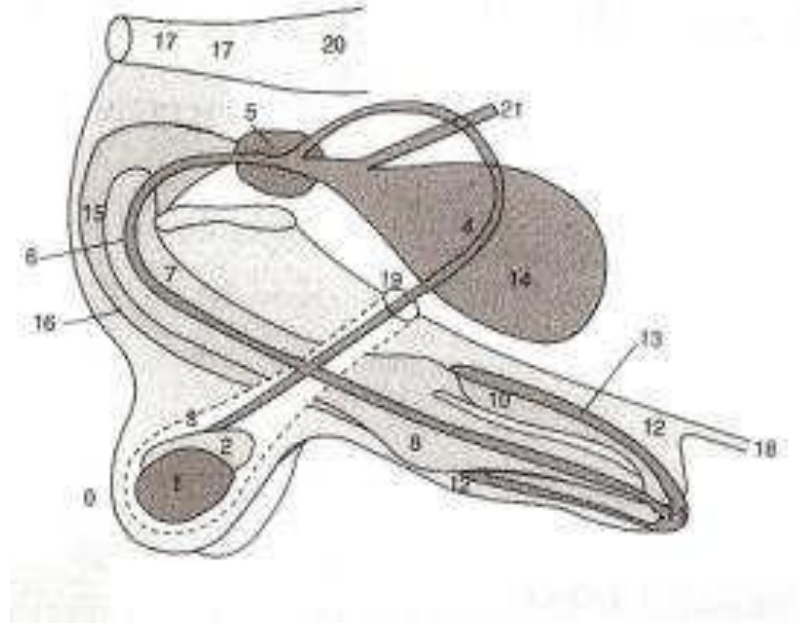


Figure n°1 : L'appareil génital mâle.
(D'après Mialot J.-P., 1984)

Légende :

0 : Scrotum	8 : Bulbe érectile	16 : Muscle rétracteur du pénis
1 : Testicule	9 : Os pénien	17 : Muscle releveur de l'an
2 : Epididyme	10 : Gland du pénis	18 : Sangle abdominale
3 : Gaine vaginale	11 : Orifice préputial	19 : Anneau inguinal
4 : Canal déférent	12 : Fourreau	20 : Rectum
5 : Prostate	13 : Cavité préputiale	21 : Uretère
6 : Urètre	14 : Vessie	
7 : Tissu érectile	15 : Muscle bulbocaverneux	

II. LA SEMENCE CANINE

La semence canine est un liquide contenant les gamètes mâles (les spermatozoïdes) et les sécrétions provenant des glandes sexuelles accessoires. Ces deux éléments se mélangent lors de l'éjaculation. (Prings, 1998)

A. Caractéristiques générales de la semence canine.

L'éjaculat de chien est un liquide blanchâtre. Le volume de l'éjaculat dépend de la race et de l'individu ; il varie de un à quatre-vingts millilitres (Johnston et al., 2001b). L'éjaculat de chien est composé de **trois fractions** présentant des caractéristiques différentes tant au niveau de leur origine que de leur composition et de leur volume (figure n°2 et tableau n°1).

Figure n°2 : Les trois phases de l'éjaculat du chien.
(Anne-Sophie Briffaut.,2007)

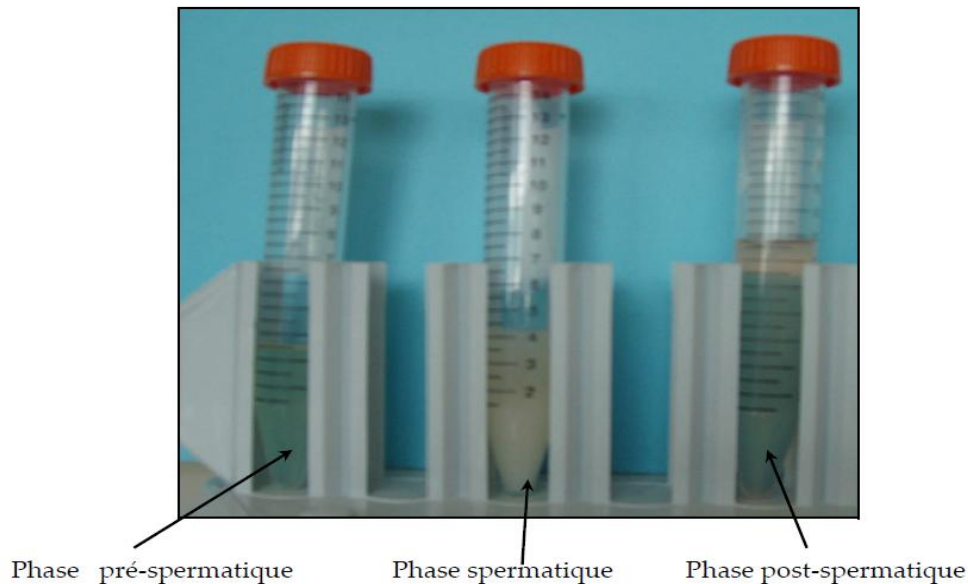


Tableau n°1 : Description des trois phases de l'éjaculat du chien.
(Fontbonne et Dumont, 1992)

	Origine	Aspect	Volume	pH	Composition
Phase pré-spermatique	Prostatique	Blanchâtre	0.2 à 2 mL	6.2 -6.5	+ Moins de 3 millions de spermatozoïdes + Liquide prostatique
Phase spermatique	Epididy-maire	Plus ou moins laiteuse	0.5 à 3.5 mL	6.3 - 6.6	+ Très riche en spermatozoïdes + Sécrétion épидидymaire
Phase post-spermatique	Prostatique	Clair	4 à 30 mL et plus	6.5 -7.0	+ Très rare spermatozoïdes + Liquide prostatique

B. Composition de la semence canine.

1. Le liquide séminal.

Le liquide séminal est composé de fluides excrétés, de cellules et de débris cellulaires provenant des glandes sexuelles accessoires. Certains éléments du liquide séminal proviennent de la filtration du plasma sanguin tandis que d'autres sont produits par les glandes sexuelles. (Prings, 1998)

2. Le spermatozoïde.

a) Définition.

Le spermatozoïde est le gamète mâle. C'est une cellule **haploïde** hautement **spécialisée**, de forme oblongue. Il mesure soixante-deux à soixante-six micromètres ; la queue mesure à elle seule cinquante-cinq micromètres. (Fontbonne et Dumont, 1992). Il présente de nombreuses différences par rapport aux cellules somatiques. Par exemple, la teneur en eau des spermatozoïdes est très inférieure à celle des cellules somatiques. Ceci est à mettre en relation avec la relative pauvreté des spermatozoïdes en cytoplasme et avec le haut degré de condensation de la chromatine (Millette, 1998).

b) Description du spermatozoïde

1. La tête.

La tête du spermatozoïde est aplatie dorso-ventralement. Elle contient le noyau, l'acrosome, le cytosquelette et le cytoplasme.

Le noyau est l'organite contenant le matériel génétique. Il est haploïde c'est-à-dire qu'il contient un seul exemplaire de chromosomes. La chromatine est très condensée. L'ADN est associé à des protamines, protéines basiques ayant la même fonction que les histones des cellules somatiques. (Millette, 1998)

L'acrosome est une structure en forme de bonnet propre aux spermatozoïdes. C'est un compartiment cellulaire coiffant le pôle antérieur du noyau. L'acrosome est une extension de l'appareil de Golgi se formant lors des dernières étapes de la spermatogenèse. Il contient un équipement enzymatique intervenant au cours de la fécondation, notamment des enzymes hydrolytiques permettant le passage de la zone pellucide et des enzymes intervenant dans la fusion du spermatozoïde avec l'ovocyte. Les deux protéines majoritaires de l'acrosome sont l'acrosine et la hyaluronidase. (Millette, 1998)

2. Le flagelle.

Le flagelle est **l'élément moteur** du spermatozoïde qui lui permet d'atteindre l'ovocyte et de pénétrer dans celui-ci. Le flagelle se divise en quatre portions : la pièce connective, la pièce intermédiaire, la pièce principale et la pièce terminale. (Millette, 1998)

Le flagelle est constitué de l'axonème, d'une gaine mitochondriale, d'une couche périphérique de fibres denses et d'une gaine fibreuse. L'axonème se situe en position centrale. Il est constitué d'une paire de microtubules centrale entourée de neuf paires de microtubules. Les microtubules sont constitués de sous-unités de α et β - tubulines associées à des protéines motrices dont la kinésine. Au niveau de la pièce intermédiaire, une spirale de mitochondries enveloppe l'axonème. Les mitochondries produisent l'ATP indispensable à la production d'énergie permettant le glissement des microtubules dans l'axonème. Au niveau de la pièce principale, la gaine fibreuse entoure l'axonème. La fibre dense est

présente à la périphérie de l'axonème au niveau de la pièce intermédiaire et d'une partie de la pièce principale. (Millette, 1998)

3. La membrane cytoplasmique.

La membrane cytoplasmique est constituée de lipides : des lipides liés à des éthers en grande quantité, des acides gras insaturés en quantité proportionnellement plus importante que dans la membrane cytoplasmique des cellules somatiques, des glycolipides, des phospholipides et des stérols. Contrairement aux lipides des membranes cytoplasmiques des cellules somatiques, la plupart des lipides membranaires des spermatozoïdes ne peuvent pas diffuser librement au sein de la membrane. (Millette, 1998) C'est une membrane **hautement spécialisée** divisée en domaines. Au niveau de la pièce intermédiaire du flagelle, la membrane plasmique contient des protéines nécessaires à la production de l'ATP mitochondriale et nécessaire à la modulation du glissement des microtubules. Au niveau de la tête des spermatozoïdes, la membrane cytoplasmique renferme des protéines intervenant dans la reconnaissance cellulaire et dans la fusion des membranes au cours de la fécondation. (Millette, 1998)

La membrane cytoplasmique subit des changements de composition : □ au niveau lipidique : pendant le passage des spermatozoïdes dans l'épididyme et dans les voies génitales femelles (changement des proportions en cholestérol et en phospholipides) ;

□ au niveau protéique: les protéines se réorganisent pendant le passage dans l'épididyme, le passage dans le tractus génital de la femelle et au cours des dernières étapes de la capacitation et de la fécondation. (Millette, 1998)

C. Récolte de la semence canine.

1. Objectifs de la récolte de sperme.

La récolte de sperme peut avoir plusieurs objectifs :

- la réalisation d'une insémination artificielle ;
- la conservation du sperme : cryoconservation ou réfrigération ;
- l'évaluation de la qualité de la semence dans différents cas : chez un vieux chien, chez des animaux qui n'ont pas reproduits depuis longtemps, chez des mâles qui ont laissés plusieurs chiennes vides ou qui ont fait de petites portées ou enfin simplement avant une saillie afin d'évaluer la qualité de la semence ;
- l'objectivation d'une pathologie ; ainsi, une évaluation de la semence peut-être indiquée en cas d'écoulements préputiaux, d'hématospermie ou d'hématurie. (Kutzler, 2005)

2. Méthodes de récolte du sperme.

a) Présentation des différentes techniques.

La méthode la plus utilisée actuellement pour le prélèvement de semence chez le chien est la récolte manuelle **par masturbation**. Cette méthode simple a été utilisée dès 1780 par l'abbé Spallanzani. (Fontbonne et Dumont, 1992)

D'autres méthodes peuvent être également citées bien que beaucoup moins utilisées telle que l'utilisation du **vagin artificiel**. Cette méthode de récolte présente l'avantage de mimer au mieux l'accouplement ; cependant elle nécessite d'avoir des vagins de taille adaptée à chaque race et elle interdit le fractionnement de l'éjaculat (Fontbonne et Dumont, 1992). **L'électroéjaculation** est une autre

méthode utilisée principalement chez le chat. Cette méthode de récolte n'est pas couramment utilisée car elle nécessite une anesthésie générale et qu'elle augmente les risques de contamination de la semence par l'urine. (Johnston et al., 2001b)

b) La récolte par stimulation digitale.

1. Matériel nécessaire.

Le matériel nécessaire à la récolte de la semence par masturbation est simple : des **cônes en caoutchouc** raccordés à des **tubes de centrifugation** stériles en plastique. D'autres récipients peuvent être utilisés mais il faut éviter les récipients en verre qui pourrait blesser le pénis du chien lors du prélèvement. (Fontbonne et Dumont, 1992)

Avant la récolte, il faut préparer trois cônes ajustés sur des tubes de centrifugation afin de pouvoir séparer les trois phases de l'éjaculat. La taille des cônes est fonction du gabarit du chien (figure n°3). L'idéal est de laisser les cônes dans une étuve afin qu'ils soient tièdes au moment du prélèvement. (Fontbonne et Dumont, 1992).

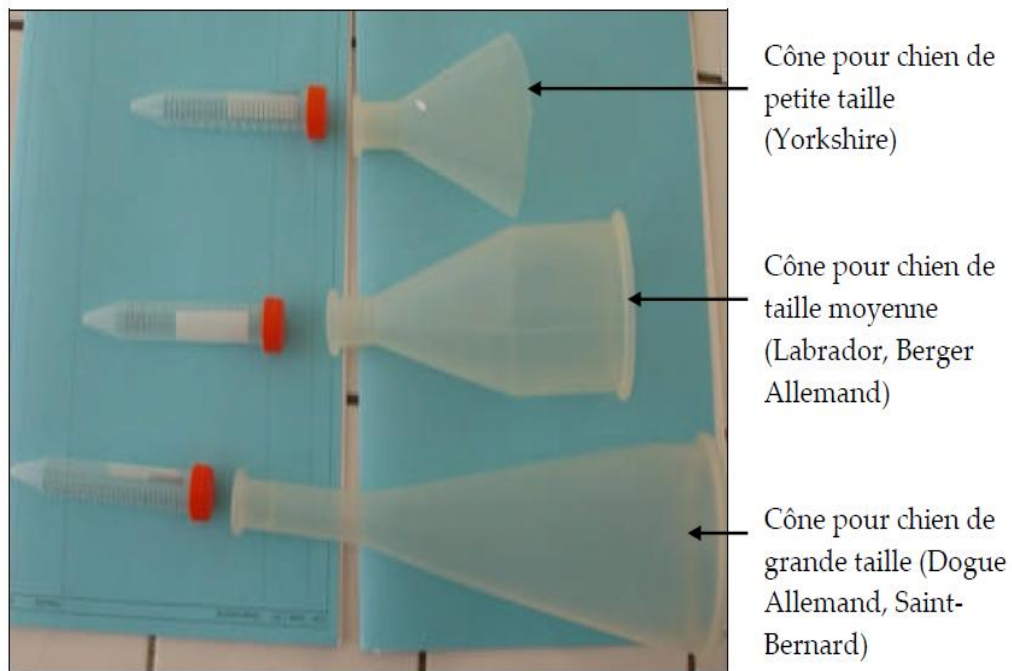


Figure n°3 : Matériel nécessaire à la récolte du sperme chez le chien.

(Anne-Sophie Briffaut.,2007)

Le nettoyage des cônes doit être effectué avec soin. Les cônes doivent être abondamment rincés car les détergents sont pour la plupart spermicides. En effet, la semence est sensible à de nombreux agents chimiques comme les détergents, le caoutchouc, le chlore, les sulfamides... Puis, les cônes doivent être soigneusement séchés afin d'ôter les résidus d'eau qui sont toxiques pour les spermatozoïdes. (Fontbonne et Dumont, 1992)

2. Environnement de la récolte.

Le prélèvement doit être effectué dans un endroit **calme**, peu bruyant, en présence d'un nombre restreint de personnes. La salle doit être de taille modérée et le sol ne doit pas être glissant. Selon les cas, le maître doit ou ne doit pas être présent. En effet, certains chiens seront inhibés par la présence du propriétaire alors que d'autres seront stimulés par celle-ci. (Fontbonne et Dumont, 1992).

3. Mise en condition du chien.

La présence d'une **chienne en œstrus** est recommandée sans être absolument nécessaire. Cependant, elle peut faciliter la récolte de chiens timides, à faible libido ou nerveux. De plus, la présence d'une chienne en chaleur augmente la qualité de l'éjaculat. (Johnston et al., 2001b)

Des **phéromones** synthétiques peuvent être appliquées sur la vulve et l'arrière train d'une femelle en œstrus voire sur un mâle castré (Feldman et Nelson, 1987). Plus simplement, des écouvillons de chiennes en œstrus peuvent être conservés à - 20 °C et présentés à la truffe du mâle pendant le prélèvement ou être appliqués à la base de la queue d'une chienne. (Kutzler, 2005)

L'injection de molécules peut également être pratiquée. Par exemple, l'injection de GnRH soixante minutes avant le prélèvement induit un relargage de testostérone et augmente ainsi la libido du chien. Cette méthode est contre indiquée chez les chiens présentant une hyperplasie bénigne de la prostate ou un adénome des glandes surrénales. L'administration de testostérone doit être prohibée car elle exerce un rétrocontrôle négatif à l'origine d'une diminution de la sécrétion de testostérone endogène et d'une diminution de la spermatogénèse. (Johnston et al., 2001b)

4. Stimulation digitale

Si l'opérateur est droitier, il se positionne à gauche du chien. Sa main droite masse le pénis du chien tandis que la gauche tient le cône de récolte. Le propriétaire se tient à la droite du chien au niveau de la tête et il oriente la tête du chien vers la vulve de la chienne si celle-ci est présente (Kutzler, 2005 ; Feldman et Nelson, 1987). Le chien peut chevaucher la chienne.

La récolte débute par un massage vigoureux en arrière des bulbes érectiles à travers le fourreau jusqu'à l'obtention de l'érection partielle. Le prépuce est alors récliné en arrière des bulbes érectiles . Parfois, le fourreau ne peut pas être repoussé en arrière des bulbes érectiles notamment lorsque les bulbes sont trop engorgés ou lorsque le chien souffre d'un paraphimosis (Kutzler, 2005 ; Fontbonne et Dumont, 1992). Le chien éprouve dans ce cas de l'inconfort voire de la douleur et l'érection peut s'arrêter (Feldman et Nelson, 1987). Une pression est ensuite appliquée à l'arrière des bulbes érectiles avec le pouce et l'index. Cette pression mime la coaptation vaginale du pénis lors du coït (Fontbonne et Dumont, 1992). Le chien va présenter des mouvements de bassin d'avant en arrière pendant quelques minutes puis il va s'arrêter et soulever un postérieur pour essayer de se retourner . Le pénis peut alors être orienté caudalement. La pression en arrière des bulbes érectiles doit être maintenue (Kutzler, 2005). A ce stade, l'érection est totale et l'éjaculation des deux premières phases a lieu ; elle dure entre deux et cinq minutes (Feldman et Nelson, 1987). Si l'érection a

tendance à diminuer, un massage de l'urètre périnéal peut être nécessaire (Fontbonne et Dumont, 1992).

La séquence se poursuit par l'éjaculation de la troisième phase ; la récolte intégrale de celle-ci n'est pas nécessaire car elle peut être longue. Il est cependant important de récolter une quantité suffisante de la troisième phase afin d'en observer l'aspect .

Après la récolte, le chien est promené plusieurs minutes afin de faciliter le recalottage du pénis dans le fourreau. Avant le départ du chien, il est important de vérifier que le pénis est entièrement recouvert par le prépuce et qu'il n'y a pas de poils coincés dans l'orifice préputial ni d'éversion de la membrane préputiale. (Kutzler, 2005)

5. Stockage de la semence après la récolte.

La semence est sensible au froid qui entraîne un choc thermique mais Également au chaud. La semence doit donc être conservée à **température Ambiante** durant son évaluation. (Fontbonne et Dumont, 1992).

E. Evaluation de la semence canine.

L'évaluation de la semence est une étape importante pour estimer la fertilité du mâle (Eilts, 2005a). L'évaluation de la semence fraîche a pour but d'évaluer le fonctionnement testiculaire et épидидymaire alors que l'évaluation de la semence congelée permet d'évaluer les dommages subis par les spermatozoïdes au cours du processus de congélation (Pena Martinez, 2004). Dans cette partie, nous évoqueront les examens de routine, réalisables par le vétérinaire et nécessitant peu de matériel, les examens réalisés en seconde intention et les nouvelles méthodes d'études du sperme utilisées dans les centres spécialisés.

1. Les examens utilisés en routine.

Ces examens sont **simples** ; ils sont effectués avant une insémination artificielle, une congélation de semence ou plus simplement dans le cadre d'une analyse de sperme en vue d'en apprécier sa qualité. Il s'agit du spermogramme et du spermocytogramme.

a) Le spermogramme.

C'est **l'étude du sperme** au sens strict. Le volume, l'aspect, l'odeur, le pH, la mobilité des spermatozoïdes, le nombre de spermatozoïdes ainsi que leur vitalité sont analysés. (Fontbonne et Dumont, 1992).

1. Le volume.

La mesure du volume donne quelques indications ; si celui-ci est trop faible, il se peut que la phase spermatique n'ait pas été entièrement (Fontbonne et Dumont, 1992).

Si l'éjaculat n'a pas été fractionné, sa mesure a peu de signification car la phase post- spermatique a un volume beaucoup plus important que celui des autres phases. De plus, le volume de l'éjaculat dépend également de la taille du chien, de son âge et de la fréquence de ses éjaculations.

Le volume est également important pour calculer le nombre total de spermatozoïdes dans l'éjaculat. (Johnston et al., 2001b)

2. L'aspect.

L'aspect de l'éjaculat est un élément important. Par exemple, l'opacité de la phase spermatique donne une première indication sur la concentration en spermatozoïdes de l'éjaculat.

Certaines **modifications de couleur** peuvent orienter vers des affections spécifiques :

□ la couleur jaune indique la présence d'urine ou la présence d'un exsudat inflammatoire ;

□ la couleur verte met en évidence la présence de pus ;

□ la couleur rouge ou brune indique la présence de sang

respectivement en nature ou digéré. Le sang digéré provient généralement de la prostate. Le sang en nature peut provenir de petites hémorragies qui se produisent pendant l'érection ;

□ un échantillon clair est évocateur d'une azoospermie (absence de spermatozoïdes dans l'éjaculat). (Feldman et Nelson, 1987 ; Freshman, 2002, Johnston et al., 2001b)

La présence d'éléments anormaux tels que l'urine, le sang ou le pus peut entraîner une diminution de la concentration, de la motilité et de la vitalité des spermatozoïdes. Une coloration anormale du sperme nécessite donc un approfondissement de l'examen du tractus génital. (Feldman et Nelson, 1987)

La présence de sang dans l'éjaculat entraîne également une altération de la qualité de la semence lors de la conservation de celle-ci. En effet, la présence d'une petite quantité de sang (supérieure à 2%) a des effets néfastes sur la qualité du sperme après congélation-décongélation. La cryoconservation entraîne une lyse des globules rouges à l'origine d'une libération d'hémoglobine qui altère les spermatozoïdes. Par contre, la présence de sang a peu d'effets néfastes sur la qualité de la semence lors de la réfrigération. (Rijsselaere, 2004)

3. L'odeur.

L'odeur du sperme donne peu d'indication. Normalement, il doit être **inodore**. La présence d'une odeur anormale peut évoquer une contamination de l'éjaculat par de l'urine, du pus ou des bactéries. (Fontbonne, 1995)

4. Le pH.

Le pH doit être compris **entre 6.4 et 6.8**. Il est important d'effectuer cette analyse lors d'asthénospermie afin d'écartier une affection de la prostate, de 44 l'urètre ou de la vessie (Fontbonne et Dumont, 1992). De plus, la mesure du pH est intéressante à connaître si une antibiothérapie doit être entreprise, les antibiotiques étant inhibés à certaines valeurs de pH (Freshman, 2002).

5. La mobilité.

La mobilité des spermatozoïdes est étudiée au microscope sur platine chauffante à 37°C entre lame et lamelle ; elle doit être effectuée rapidement après le prélèvement. La mobilité est diminuée par les températures extrêmes, les diluants acides, l'urine, le pus, le sang et le lubrifiant. Il faut noter que la mobilité est augmentée à proximité des bulles d'air et est diminuée au niveau des bords de la lamelle. (Feldman et Nelson, 1987 ; Johnston et al., 2001b) Dans un premier temps, le sperme est regardé au faible grossissement de façon à apprécier **la mobilité massale**, c'est-à-dire les mouvements de réunions et de dispersion des spermatozoïdes. Cette observation est subjective. Une échelle d'appréciation dérivée de celle des bovins peut être utilisée : une note variant de zéro à cinq est attribuée. Le zéro correspond à un échantillon dans lequel les spermatozoïdes sont tous immobiles et le cinq correspond à un échantillon dans lequel les spermatozoïdes ont un mouvement d'ensemble dense donnant une impression de vagues. Dans un deuxième temps, le sperme est examiné au fort grossissement entre lame et lamelle afin d'apprécier la mobilité progressive : le pourcentage de spermatozoïdes qui sont en mouvement ainsi que leur vitesse et leur trajectoire

est estimé. Les spermatozoïdes qui traversent rapidement le champ du microscope sont nommés **spermatozoïdes fléchants**. (Fontbonne et Dumont, 1992 ; Fontbonne, 1995)

Si la semence est trop concentrée, elle est diluée dans une solution tampon saline. L'évaluation de la mobilité permet également d'observer d'éventuelles agglutinations des spermatozoïdes. (Freshman, 2002)

Cet examen ne permet cependant pas de connaître la fertilité du mâle avec certitude car des spermatozoïdes mobiles peuvent présenter des altérations de la membrane plasmique ou de l'acrosome qui auront des répercussions sur la fertilité mais pas sur la mobilité. (Eilts, 2005a)

6. La numération.

La numération est la détermination du **nombre de spermatozoïdes dans l'éjaculat**. Elle peut être effectuée par des méthodes automatisées réservées aux centres spécialisés ou par des méthodes manuelles. Cette analyse n'a pas de valeur prédictive quant à la qualité de la semence sauf si le chien présente une azoospermie c'est-à-dire une absence totale de spermatozoïdes. La taille du chien doit être prise en compte lors de cet examen car le nombre de spermatozoïdes est proportionnel au poids des testicules lui-même corrélé à la taille du chien. (Johnston et al., 2001b) Les méthodes manuelles sont rapides, simples et ne nécessitent pas

beaucoup de matériel. Le sperme est tout d'abord dilué dans un liquide hypertonique comme du chlorure de sodium à 3% qui immobilise les spermatozoïdes. Cette dilution est effectuée dans des mélangeurs de Potain utilisés habituellement pour le comptage des cellules sanguines. Si le sperme semble concentré en spermatozoïdes à l'examen microscopique au faible grossissement, une dilution au centième voire au deux centième est effectuée alors que si le sperme est peu concentré, une dilution au dixième voire au vingtième suffit. Une fois la dilution effectuée, une goutte de la préparation est déposée sur une cellule hématimétrique : cellule de Neubauer, de Malassez ou de Thoma. Les spermatozoïdes sont comptés selon des règles strictes et des facteurs multiplicatifs permettent d'obtenir la concentration et le nombre total de spermatozoïdes dans l'éjaculat (figure n°9). L'interprétation de la concentration est délicate car elle dépend de la quantité de fluide prostatique récoltée lors du prélèvement. (Feldman et Nelson, 1987 ; Fontbonne et Dumont, 1992)

7. La vitalité.

La vitalité est le pourcentage de **spermatozoïdes vivants**. Ce paramètre donne une bonne indication de la qualité de la semence. L'éosine-nigrosine est un colorant permettant d'évaluer la vitalité. En effet, il permet de différencier les spermatozoïdes morts qui seront colorés en rose des spermatozoïdes vivants qui eux resteront incolores. Il faut toutefois noter que cette coloration donne des résultats variables suivant l'origine du colorant et le temps de trempage dans celui-ci. (Fontbonne, 1995)

c) Conclusion de l'examen de la semence.

La plupart des auteurs estiment que la dose nécessaire pour féconder une chienne est comprise entre **100 et 150 millions de spermatozoïdes normaux et mobiles par éjaculat**. De plus, le pourcentage de **spermatozoïdes anormaux** ne doit pas excéder **vingt à trente pour cent** et la **mobilité** doit être supérieure à **soixante dix pour cent** pour que la semence soit de bonne qualité. (Feldman et Nelson, 1987 ; Fontbonne et Dumont, 1992 ; Johnston et al., 2001b)

Il semble que les caractéristiques de la semence étant les plus corrélées avec la fertilité soient la concentration de l'éjaculat en spermatozoïdes, le pourcentage de mobilité progressive et la morphologie des spermatozoïdes (Feldman et Nelson, 1987). Une étude réalisée par Oettlé en 1993 a montré que les chiens ayant soixante pour cent ou plus de spermatozoïdes normaux ont une fertilité de soixante pour cent. Alors que si les chiens ont moins de soixante pour cent de spermatozoïdes normaux, leur fertilité chute à treize pour cent. (Oettlé, 1993)

Une semence ne peut être qualifiée de mauvaise qualité que si l'évaluation de la semence a été répétée plusieurs fois à quelques jours d'intervalle et que les anomalies observées sont pérennes. En effet, après une longue abstinence, la semence peut être de mauvaise qualité avec notamment un pourcentage élevé de spermatozoïdes anormaux. (Johnston et al., 2001b)

Les examens utilisables en routine sont simples ; il ne nécessite pas beaucoup de matériel. Cependant, l'évaluation de la mobilité ainsi que lespermocytogramme sont des examens subjectifs qui dépendent de l'opérateur. De plus, ces examens ne permettent pas d'évaluer l'aptitude des spermatozoïdes à devenir fertile c'est-à-dire à effectuer les différentes étapes 51 nécessaires à la fécondation au moment adéquate dans les voies génitales femelles. (Rodriguez-Martinez et al., 1993)

2. Examens réalisables en seconde intention.

I. LETESTHYPO-OSMOTIQUE.

A. Principe.

Ce test permet d'évaluer l'intégrité membranaire des cellules. Il fut utilisé dès 1966 sur les spermatozoïdes de taureaux, de lapins et d'hommes par Drevius et Eriksson. Mais c'est Jeyendran et al. qui en 1984 utilisèrent ce test en vue d'évaluer la fonctionnalité de la membrane plasmique. En effet, les cellules présentant une membrane plasmique intacte ont la capacité de se déformer et d'évacuer l'eau (Eilts, 2005a). Lorsque la cellule est exposée à des conditions hypo-osmotiques, l'eau va pénétrer dans le milieu intracellulaire jusqu'à ce que l'équilibre osmotique soit atteint de part et d'autre de la membrane. La cellule va donc gonfler. Ce phénomène est particulièrement visible au niveau de la queue des spermatozoïdes. (Jeyendran et al., 1984)

Ce test permet donc de vérifier l'intégrité de la membrane plasmique. Or la membrane plasmique intervient dans la capacitation, la réaction acrosomique et l'attachement des gamètes qui sont des phénomènes indispensables à la fécondation (Jeyendran et al., 1984). De plus, il présente l'avantage d'être simple, fiable et répétable (England et Plummer, 1993).

B . Méthode.

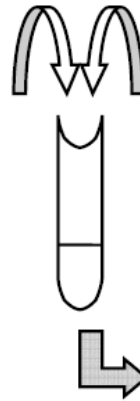
La semence est mélangée à une **solution hypotonique** puis le mélange est incubé au bain-marie à 37°C (figure n°5). Les spermatozoïdes sont ensuite observés au microscope optique à contraste de phase.

Rodriguez-Gil et son équipe ont montré que le nombre de spermatozoïdes répondant positivement au test dépend du temps d'incubation et que le pourcentage maximum de spermatozoïdes gonflés est observé pour des durées comprises entre quarante-cinq et soixante minutes (Rodriguez-Gil et al., 1994).

Kumi-Diaka a montré que le temps d'incubation optimal est de quarante-cinq minutes pour une solution de fructose à 60 mOsmol/l (Kumi-Diaka, 1993).

0,1 mL de fraction spermatique hypotonique

1 mL de solution



Bain-marie pendant au moins 30 min à 37 °C

Figure n°4 : Réalisation du test hypo-osmotique.

Les spermatozoïdes dont la membrane cytoplasmique est intègre se déforment (figure n°7). Ces spermatozoïdes se reconnaissent à leur flagelle qui s'enroule ou se recourbe (Fontbonne, 1995). Selon la forme qu'ils prennent, ils sont classés en sept catégories de « a » à « g » (figure n°6). Les catégories les plus aisés à reconnaître sont les catégories b, e et g. (England et Plummer, 1993)

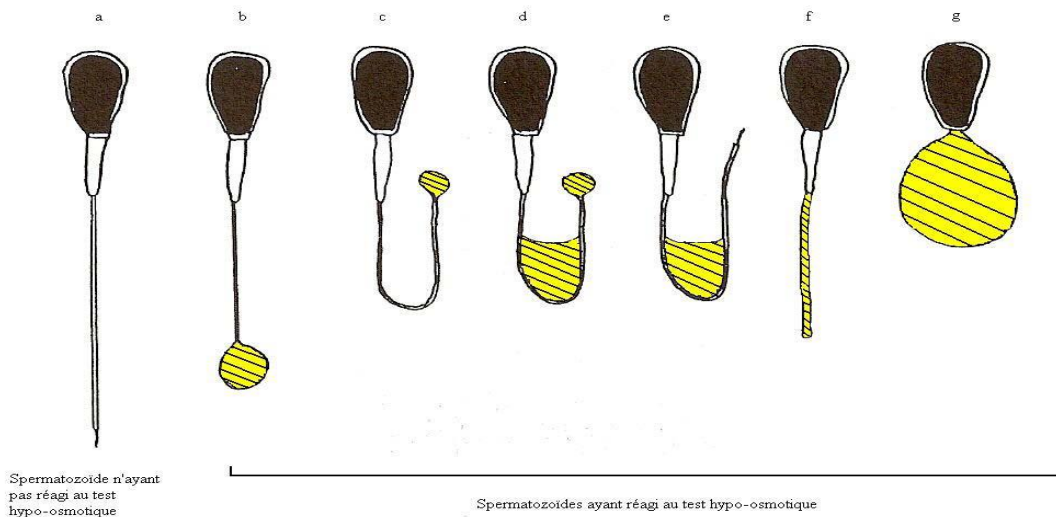
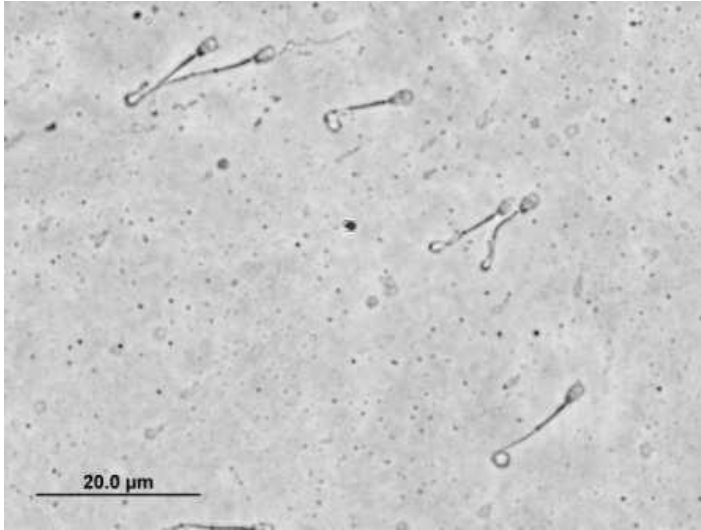
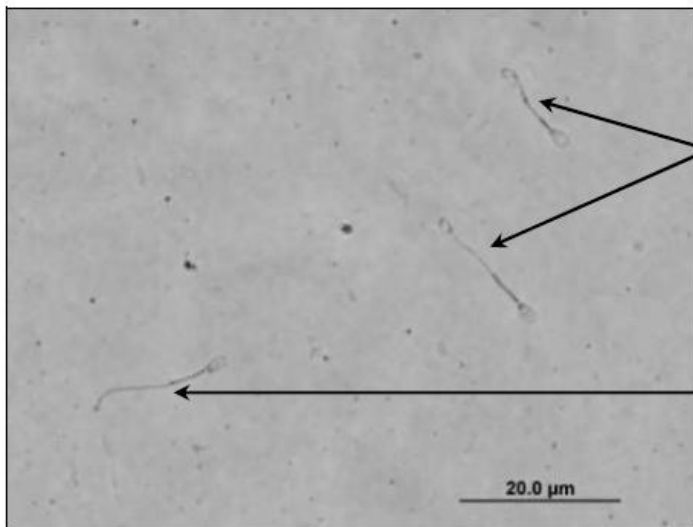


Figure n°5 : Les modifications morphologiques des spermatozoïdes soumis au test hypo-osmotique.
(D'après Jeyendran et al., 1984)



Tous les spermatozoïdes de cette lame ont réagi Positivement au test hypo-osmotique.



Spermatozoïdes ayant réagi positivement au test hypo-osmotique.

Spermatozoïde n'ayant pas réagi au test hypo-osmotique.

Figure n°6 : Spermatozoïdes soumis au test hypo-osmotique.

(Anne-Sophie Briffaut.,2007)

C. Comparaison de différentes méthodes.

De nombreuses méthodes ont été proposées par les auteurs concernant la composition de la solution hypo-osmotique et le temps d'incubation.

Jeyendran et son équipe ont montré dans une étude réalisée sur des spermatozoïdes humains que le pourcentage de spermatozoïdes répondant positivement au test est maximum avec une solution composée de 50 % de fructose et de 50 % de citrate de sodium et un temps d'incubation de trente minutes. Cette solution de 150 mOsmol/l est composée de 7.35 grammes de citrate de sodium et de 13.51 grammes de fructose dissous dans un litre d'eau (Jeyendran et al., 1984). D'autres auteurs obtiennent de meilleurs résultats avec une solution composée de fructose uniquement (Kumi-Diaka, 1993).

England et Plummer ont montré qu'une solution de 150 mOsmol/l composée de trois quarts de fructose et d'un quart de citrate produit significativement plus de spermatozoïdes de type b et g que d'autres proportions, deux types morphologiques facilement identifiables (England et Plummer, 1993). De plus, Dufour a montré que le coefficient de corrélation entre une pression osmotique de la solution de 72 mOsmol/kg d'eau et une pression osmotique de 140 mOsmol/kg d'eau est élevé (Dufour, 1998).

Cependant, **Rodriguez-Gil et son équipe** ont montré qu'une pression osmotique inférieure à 100 mOsmol/l entraîne une bonne réponse des spermatozoïdes au test mais que ces pressions sont à l'origine de l'apparition de nombreuses anomalies, de mortalité et du détachement de l'acrosome alors que pour des pressions comprises entre 100 et 150 mOsmol/l, le nombre de spermatozoïdes répondant positivement est importants mais qu'il n'y a pas de diminution de la vitalité des cellules (Rodriguez-Gil, 1994).

Hishinuma et Sekine ont réalisé une étude sur le test hypo-osmotique en utilisant de l'eau ultra-pure comme solution hypotonique. Ils ont mélangé 0.1 mL de sperme avec 0.4 mL d'eau ultra-pure et laissé incuber la solution obtenue pendant cinq minutes à 38.5 °C. Ils ont mis en évidence une corrélation significative entre le test hypo-osmotique conventionnel et le test utilisant de l'eau ultra-pure ($r=0.86$). Ce test simple à réaliser est plus rapide, le temps d'incubation étant plus court. De plus, dans le test à l'eau ultra-pure, le pourcentage de forme de type g, forme facilement reconnaissable est significativement plus important que dans le test conventionnel. (Hishinuma et Sekine, 2003)

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

England et Plummer montrent qu'il n'y a pas de corrélation entre le pourcentage de spermatozoïdes ayant répondu positivement au test hypo-osmotique et le pourcentage de spermatozoïdes mobiles (England et Plummer, 1993). Cependant, d'autres auteurs arrivent au résultat inverse et montrent qu'il y a une corrélation entre le pourcentage de spermatozoïdes ayant gonflé au cours de ce test et la mobilité des spermatozoïdes (Hishinuma et Sekine, 2003 ; Kumi-Diaka, 1993 ; Kumi-Diaka et Badtram, 1994 ; Rodriguez-Gil et al., 1994). Kumi-Diaka et Badtram expliquent cette corrélation par la nécessité d'une membrane plasmique intègre pour le déplacement des spermatozoïdes (Kumi-Diaka et Badtram, 1994).

PARTIE EXPERIMENTALE

INTRODUCTION

Dans le contexte clinique (en dehors des laboratoires spécialisés), l'évaluation de la semence se fait avant insémination artificielle ou avant expédition de la semence (insémination à distance ou banque de sperme). Elle se fait habituellement par une batterie de tests (spermogramme de routine) qui comprend l'évaluation de la mobilité massale et individuelle, de la vitalité (coloration à l'éosine-nigrosine) ainsi que la concentration spermatique (numération).

Le test de gonflement hypo-osmotique (HOST) est un test fonctionnel qui permet d'évaluer l'intégrité membranaire flagellaire des spermatozoïdes. Il consiste à faire incuber le sperme dans un milieu hypo-osmotique à 37°C pendant un certain temps et à observer (sur frottis) et quantifier les spermatozoïdes qui ont réagi par gonflement et incurvation de leurs flagelles et ceux qui sont restés non réactionnels.

Le protocole de réalisation du HOST, décrit en espèce canine par ENGLAND et PLUMMER en 1993, rapporte un temps d'incubation de 60mn à 37°C dans une solution hypo-osmotique de 100mOsmol composée de fructose et de citrate de sodium (Protocole de référence).

Cependant le temps d'incubation d'une heure et la préparation au laboratoire d'une solution hypo-osmotique ont constitué une contrainte pratique empêchant d'intégrer ce test dans la cadre d'un spermogramme de routine.

Notre objectif est d'essayer de simplifier ce test de manière à permettre de l'intégrer dans le spermogramme rapide. Pour cela nous allons comparer simultanément cinq durées d'incubation (0mn, 15mn, 30mn, 45mn, 60mn) et quatre osmolarités de la solution hypo-osmotique (0mOsmol, 50mOsmol, 100mOsmol, 150mOsmol) à la recherche du meilleur couple « temps d'incubation-osmolarité » qui puisse donner le même résultat que le protocole de référence.

I. MATERIEL ET METHODE

A. Animaux.

Nous avons prélevé treize (13) éjaculats à partir de cinq (05) chiens différents récoltés à 72 h d'intervalle minimal.

Les chiens utilisés pour notre expérimentation sont deux 2 chiens Berger Allemand de 2 ans (Eric), (Esko), un chien Berger Belge de 5 ans (Sam), un chien Rottweiler de 2 ans (Wellis), un chien Dogue Argentin de 2 ans (Enzo)

Tous les chiens ayant servi à la récolte étaient en bonne santé et de fertilité confirmée par leurs propriétaires.

B. Méthode de récolte.

Le prélèvement de sperme est effectué par stimulation digitale en présence d'une chienne en chaleur et en se servant d'un cône de récolte en Latex (modèle bovin) à l'extrémité duquel est attaché un tube de récolte en verre pyrex.

Le sperme est récolté en trois phases séparées recueillies dans trois tubes différents à savoir :

La fraction urétrale (pré spermatique)

La fraction epididymaire (spermatique)

La fraction prostatique (post spermatique)

C. Evaluation initiale de la semence

Avant d'inclure l'éjaculat dans notre étude, une évaluation initiale a été effectuée incluant la mobilité massale, la mobilité individuelle, la vitalité et la numération des spermatozoïdes (concentration spermatique).

La mobilité massale est évaluée en déposant une goutte épaisse de sperme sur une lame porte objet placée sur la platine chauffante à 37°C d'un microscope à contraste de phase négatif (Nikon E200, Japan). L'observation est faite au grossissement 100x (Objectif x10 PH1-) immédiatement après la récolte.

La note de mobilité est donnée sur une échelle de 5 selon la méthode de MILOVANOVA. Seuls les éjaculats ayant une mobilité massale de 3 et plus sont inclus dans l'étude.

La mobilité individuelle est évaluée en déposant une goutte de sperme diluée au liquide prostatique entre lame et lamelle placée sur la platine chauffante à 37°C d'un microscope à contraste de phase négatif (Nikon E200, Japan). L'observation est faite au grossissement 100x (Objectif x10 PH1-) immédiatement après la récolte.

Le pourcentage de mobilité individuelle est donné après comptage subjectif des spermatozoïdes fléchant se déplaçant rapidement sur une trajectoire rectiligne ou en grande courbe. Seuls les éjaculats ayant une mobilité individuelle de 70% et plus sont inclus dans l'étude.

La vitalité est évaluée sur lame de frottis confectionnés après coloration vitale à l'éosine-nigrosine. Une goutte de sperme est mélangée à une goutte d'éosine à 37°C et laissée réagir pendant 30 secondes, ensuite deux gouttes de nigrosine sont ajoutées au mélange et le frottis est préparé de suite.

L'éosine est un colorant vital qui ne pénètre que dans les têtes des spermatozoïdes morts leur donnant ainsi une couleur rouge orangée et les vivants resteront non colorés (blanc). La nigrosine est un contre-colorant qui facilite l'observation des spermatozoïdes sur un fond foncé (violet).

La numération des spermatozoïdes est effectuée au microscope photonique au grossissement 400x (Objectif 40x) sur un hématimètre de THOMA après dilution du sperme au 1/100ème dans une solution saline hypertonique à 4% afin d'immobiliser les spermatozoïdes et permettre leur comptage. La concentration a été calculée et exprimée en millions/mL.

Seuls les éjaculats ayant une concentration d'au moins $200 \cdot 10^6$ spermatozoïdes/mL sont inclus dans l'étude.

D.LE TEST HYPO-OSMOTIQUE :

1. Préparation des Solutions Hypo-Osmotique :

Avant chaque récolte, quatre solutions hypo-osmotique d'osmolarités différentes (0, 50, 100 et 150mOsmol) ont été fraîchement préparées et leur osmolarités ont été contrôlées au moyen d'un osmomètre manuel à point cryoscopique (**Marque, pays**).

Pour la préparation de la solution hypo-osmotique, nous avons utilisé intentionnellement en vue de simplifier le test, un soluté de perfusion salé isotonique stérile (NaCl à 0.9%) avec une osmolarité contrôlée de 312mOsmol. Des dilutions à l'eau distillée stérile ont été effectuées afin d'obtenir les différentes osmolarités étudiées (Tableau n°4).

Tableau n°2 : Préparation des solutions Hypo-Osmotiques.

	00 mOsmol	50 mOsmol	100 mOsmol	150 mOsmol
Eau Distillé (ml)	100	100	150	100
Na Cl 9% (ml)	00	20	50	100

2. Préparation et lecture des lames de frottis-HOST:

Un volume de 1mL de chaque solution hypo-osmotique (0, 50, 100 et 150mOsmol) a été mis dans un tube eppendorf maintenu en bain marie à 37°C puis 100µl de sperme ont été ajoutés à chaque tube.

Les quatre tubes (mélange sperme solution hypo-osmotique) ont été mis à incuber pendant des Temps différents (00 min, 15 min, 30 min, 45 min, 60 min) dans une étuve de paillasse (Nüve,) à 37°C.

Figure n°7 : Etuve utilisé pour l'incubation des solutions préparés



Les lames porte-objet ont été pré identifiées (nom du chien, n° d'éjaculat, Osmolarité de la solution et Temps d'incubation) et conservées à l'étuve à 37°C jusqu'à la préparation du frottis.

A l'issue de chaque temps d'incubation (00 min, 15 min, 30 min, 45 min, 60 min), des frottis sur lame ont été confectionnés à partir de chaque tube.

Ainsi, nous obtenons un factoriel 4x5 par croisement de 4 osmolarités (0, 50, 100 et 150mOsmol) avec 5 temps d'incubation (00 min, 15 min, 30 min, 45 min, 60 min).

Ainsi nous avons préparé 20 lames de frottis-HOST pour chaque éjaculat totalisant 260 lames pour les 13 éjaculats étudiés.

Les lames sont lues au microscope optique au grossissement $\times 400$. Cent spermatozoïdes sont observés et les spermatozoïdes ayant réagi positivement au test hypo-osmotique sont comptabilisés.

Les résultats ont été portés sur un fichier MicroSoft Excell pour être exploités ultérieurement.

II. RESULTATS

A. Caractéristiques de la semence fraîche.

Tableau n°3 : Caractéristiques de la semence Fraiche

	Wellis			Enzo			Sam				Eric		Esko
	EJ01	EJ02	EJ03	EJ01	EJ02	EJ03	EJ01	EJ02	EJ03	EJ04	EJ01	EJ02	EJ01
Volume (ml)	2.1	1.8	2	2.2	2.1	1.9	2	2	1.6	1.8	2.3	2	2
Mobilité Massale (1-5)	3	5	5	4	5	5	2	4	5	4	3	4	4
Mobilité individuelle(%)	65%	85%	90%	70%	85%	85%	50%	75%	80%	80%	70%	85%	75%
Concentration (Ml/ml)	245	475	725	325	375	325	275	150	320	295	325	285	350
Vitalité (%)	78%	84%	90%	75%	88%	87%	45%	%82	%85	%88	%87	%91	%83

B. Résultats des tests HYPO-OSMOTIQUES :

Tableau n°4 : Réactions des Spz de l'Ejaculat 01 du chien Eric

	00 mOsmol	50 mOsmol	100 mOsmol	150 mOsmol
T= 00 min	Spz Réact : 80% Spz Non Réact : 20%	Spz Réact : 72% Spz Non Réact : 28%	Spz Réact : 68% Spz Non Réact : 32%	Spz Réact : 62% Spz Non Réact : 37%
T= 15 min	Spz Réact : 82% Spz Non Réact : 18%	Spz Réact : 76% Spz Non Réact : 24%	Spz Réact : 74% Spz Non Réact : 26%	Spz Réact : 67% Spz Non Réact : 33%
T= 30 min	Spz Réact : 85% Spz Non Réact : 15%	Spz Réact : 80% Spz Non Réact : 20%	Spz Réact : 79% Spz Non Réact : 21%	Spz Réact : 73% Spz Non Réact : 27%
T= 45 min	Spz Réact : 85% Spz Non Réact : 15%	Spz Réact : 79% Spz Non Réact : 21%	Spz Réact : 79% Spz Non Réact : 21%	Spz Réact : 72% Spz Non Réact : 28%
T= 60 min	Spz Réact : 84% Spz Non Réact : 16%	Spz Réact : 80% Spz Non Réact : 20%	Spz Réact : 79% Spz Non Réact : 21%	Spz Réact : 72% Spz Non Réact : 28%

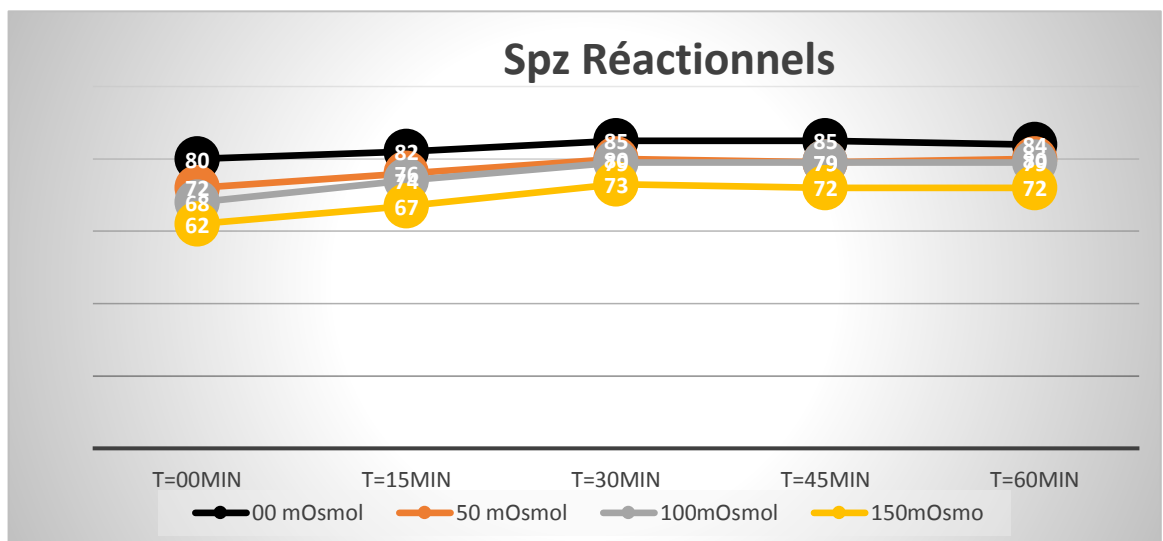


Tableau n°5 : Réactions des Spz de l'Ejaculat 02 du chien Eric

	00 mOsmol	50 mOsmol	100 mOsmol	150 mOsmol
T= 00 min	Spz Réact : 88% Spz Non Réact : 12%	Spz Réact : 80% Spz Non Réact : 20%	Spz Réact : 74% Spz Non Réact : 26%	Spz Réact : 62% Spz Non Réact : 38%
T= 15 min	Spz Réact : 91% Spz Non Réact : 9%	Spz Réact : 82% Spz Non Réact : 18%	Spz Réact : 77% Spz Non Réact : 23%	Spz Réact : 70% Spz Non Réact : 30%
T= 30 min	Spz Réact : 90% Spz Non Réact : 10%	Spz Réact : 85% Spz Non Réact : 15%	Spz Réact : 79% Spz Non Réact : 21%	Spz Réact : 75% Spz Non Réact : 25%
T= 45 min	Spz Réact : 89% Spz Non Réact : 11%	Spz Réact : 82% Spz Non Réact : 18%	Spz Réact : 78% Spz Non Réact : 22%	Spz Réact : 73% Spz Non Réact : 27%
T= 60 min	Spz Réact : 90% Spz Non Réact : 10%	Spz Réact : 83% Spz Non Réact : 17%	Spz Réact : 77% Spz Non Réact : 23%	Spz Réact : 74% Spz Non Réact : 26%

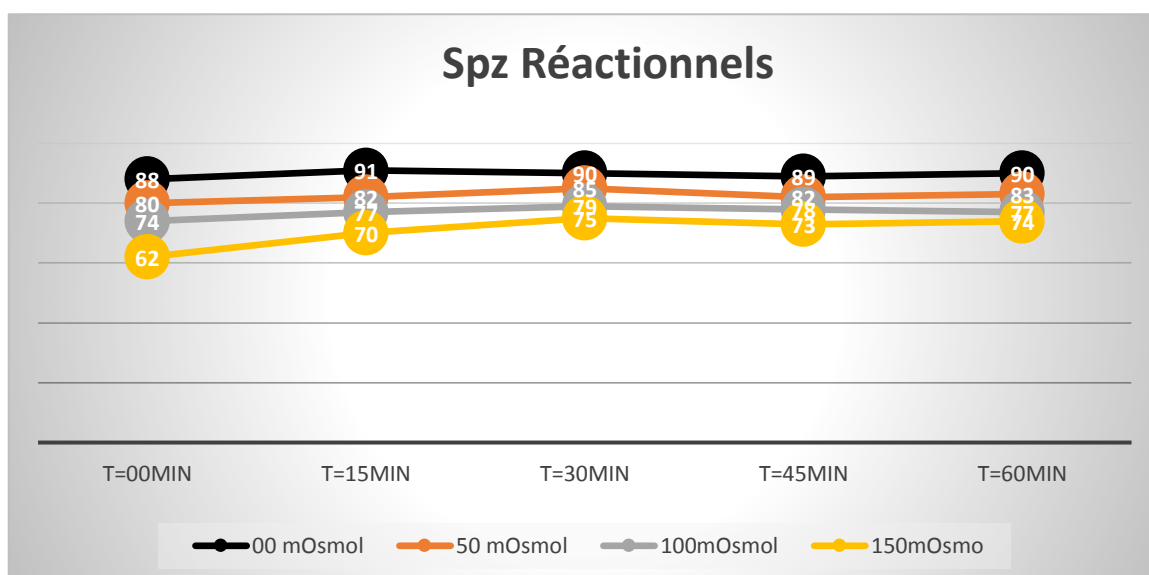


Tableau n°6 : Réactions des Spz de l'Ejaculat 01 du chien Sam

	00 mOsmol	50 mOsmol	100 mOsmol	150 mOsmol
T= 00 min	Spz Réact : 68% Spz Non Réact : 32%	Spz Réact : 58% Spz Non Réact : 42%	Spz Réact : 51% Spz Non Réact : 49%	Spz Réact : 48% Spz Non Réact : 52%
T= 15 min	Spz Réact : 73% Spz Non Réact : 27%	Spz Réact : 63% Spz Non Réact : 37%	Spz Réact : 58% Spz Non Réact : 42%	Spz Réact : 50% Spz Non Réact : 50%
T= 30 min	Spz Réact : 75% Spz Non Réact : 25%	Spz Réact : 65% Spz Non Réact : 35%	Spz Réact : 61% Spz Non Réact : 39%	Spz Réact : 55% Spz Non Réact : 45%
T= 45 min	Spz Réact : 73% Spz Non Réact : 27%	Spz Réact : 62% Spz Non Réact : 38%	Spz Réact : 60% Spz Non Réact : 40%	Spz Réact : 53% Spz Non Réact : 47%
T= 60 min	Spz Réact : 74% Spz Non Réact : 26%	Spz Réact : 64% Spz Non Réact : 36%	Spz Réact : 60% Spz Non Réact : 40%	Spz Réact : 52% Spz Non Réact : 48%

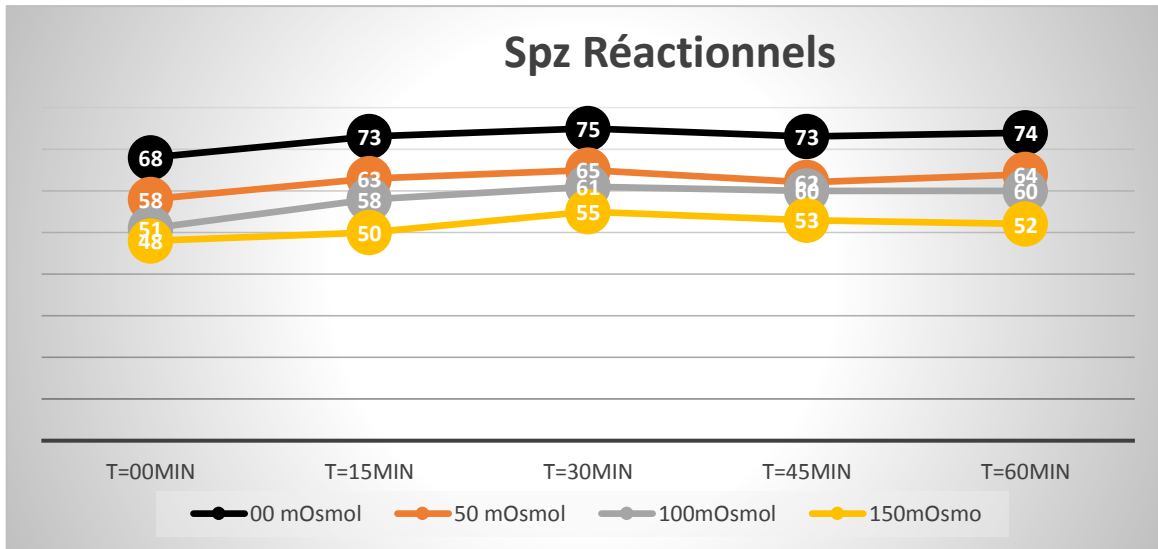


Tableau n°7 : Réactions des Spzs de l'Ejaculat 02 du chien Sam

T= 00 min	Spz Réact : 75% Spz Non Réact : 25%	Spz Réact : 69% Spz Non Réact : 31%	Spz Réact : 63% Spz Non Réact : 37%	Spz Réact : 56% Spz Non Réact : 44%
T= 15 min	Spz Réact : 77% Spz Non Réact : 23%	Spz Réact : 72% Spz Non Réact : 28%	Spz Réact : 66% Spz Non Réact : 34%	Spz Réact : 59% Spz Non Réact : 41%
T= 30 min	Spz Réact : 80% Spz Non Réact : 20%	Spz Réact : 77% Spz Non Réact : 23%	Spz Réact : 71% Spz Non Réact : 29%	Spz Réact : 61% Spz Non Réact : 39%
T= 45 min	Spz Réact : 81% Spz Non Réact : 19%	Spz Réact : 75% Spz Non Réact : 25%	Spz Réact : 70% Spz Non Réact : 30%	Spz Réact : 59% Spz Non Réact : 41%
T= 60 min	Spz Réact : 79% Spz Non Réact : 21%	Spz Réact : 76% Spz Non Réact : 24%	Spz Réact : 69% Spz Non Réact : 31%	Spz Réact : 60% Spz Non Réact : 40%

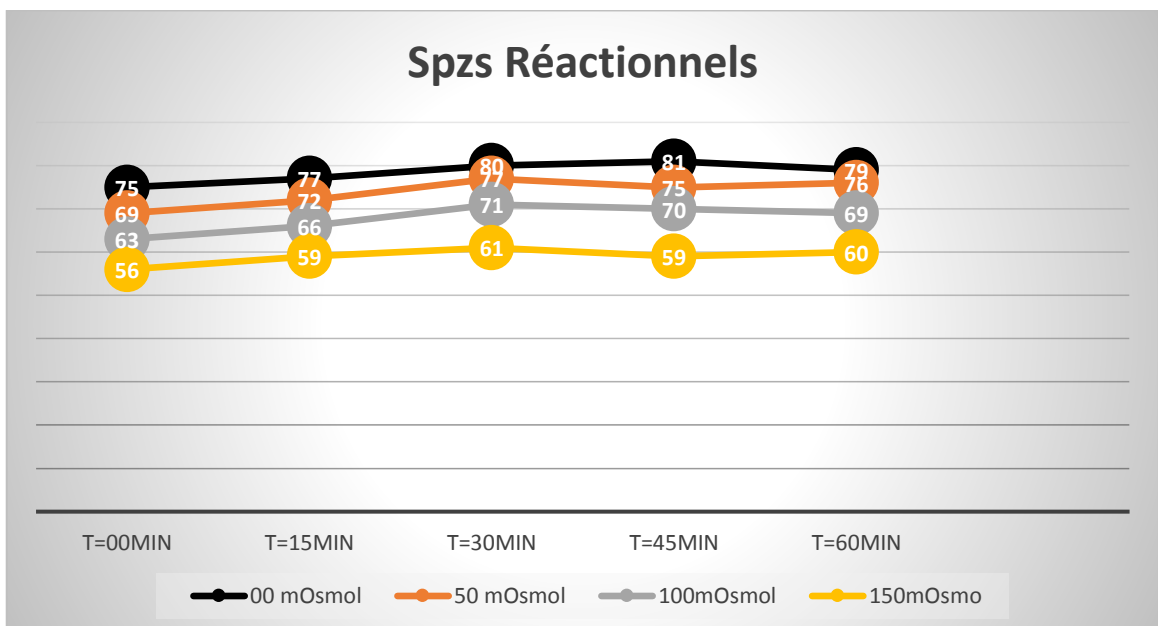


Tableau n°8 : Réactions des Spz de l'Ejaculat 03 du chien Sam

	00 mOsmol	50 mOsmol	100 mOsmol	150 mOsmol
T= 00 min	Spz Réact : 79% Spz Non Réact : 21%	Spz Réact : 70% Spz Non Réact : 30%	Spz Réact : 68% Spz Non Réact : 32%	Spz Réact : 60% Spz Non Réact : 40%
T= 15 min	Spz Réact : 83% Spz Non Réact : 17%	Spz Réact : 73% Spz Non Réact : 27%	Spz Réact : 71% Spz Non Réact : 29%	Spz Réact : 66% Spz Non Réact : 34%
T= 30 min	Spz Réact : 85% Spz Non Réact : 15%	Spz Réact : 79% Spz Non Réact : 21%	Spz Réact : 75% Spz Non Réact : 25%	Spz Réact : 70% Spz Non Réact : 30%
T= 45 min	Spz Réact : 84% Spz Non Réact : 16%	Spz Réact : 78% Spz Non Réact : 22%	Spz Réact : 75% Spz Non Réact : 25%	Spz Réact : 69% Spz Non Réact : 31%
T= 60 min	Spz Réact : 85% Spz Non Réact : 15%	Spz Réact : 79% Spz Non Réact : 21%	Spz Réact : 73% Spz Non Réact : 27%	Spz Réact : 69% Spz Non Réact : 31%

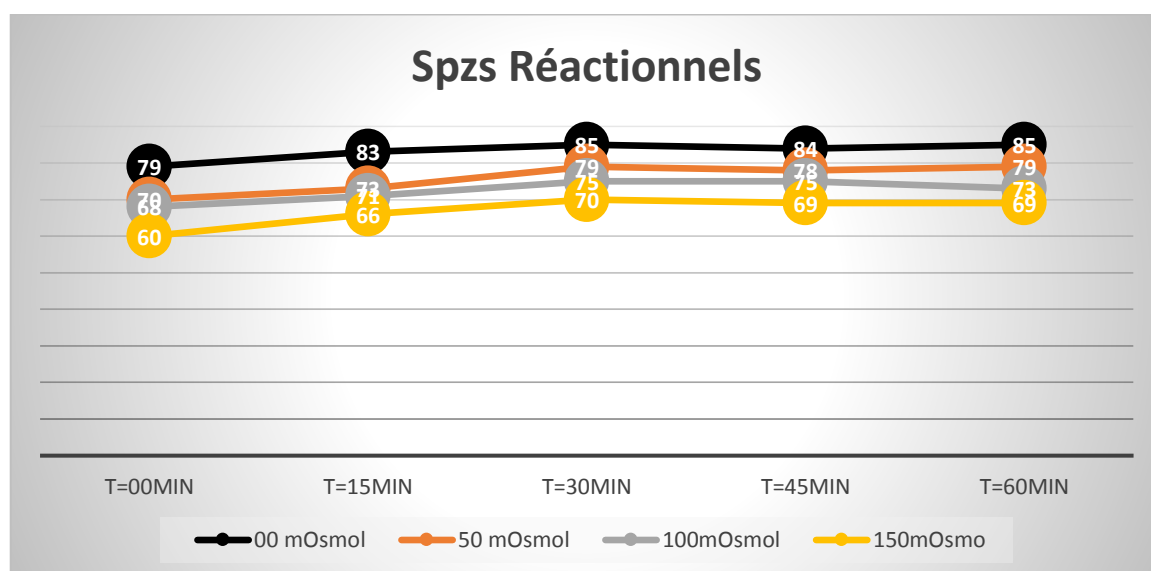


Tableau n°9 : Réactions des Spz de l'Ejaculat 04 du chien Sam

	00 mOsmol	50 mOsmol	100 mOsmol	150 mOsmol
T= 00 min	Spz Réact : 80% Spz Non Réact : 20%	Spz Réact : 75% Spz Non Réact : 25%	Spz Réact : 71% Spz Non Réact : 29%	Spz Réact : 65% Spz Non Réact : 35%
T= 15 min	Spz Réact : 83% Spz Non Réact : 17%	Spz Réact : 77% Spz Non Réact : 23%	Spz Réact : 74% Spz Non Réact : 26%	Spz Réact : 69% Spz Non Réact : 31%
T= 30 min	Spz Réact : 85% Spz Non Réact : 15%	Spz Réact : 80% Spz Non Réact : 20%	Spz Réact : 76% Spz Non Réact : 24%	Spz Réact : 74% Spz Non Réact : 26%
T= 45 min	Spz Réact : 85% Spz Non Réact : 15%	Spz Réact : 79% Spz Non Réact : 21%	Spz Réact : 75% Spz Non Réact : 25%	Spz Réact : 73% Spz Non Réact : 27%
T= 60 min	Spz Réact : 85% Spz Non Réact : 15%	Spz Réact : 78% Spz Non Réact : 22%	Spz Réact : 74% Spz Non Réact : 26%	Spz Réact : 74% Spz Non Réact : 26%

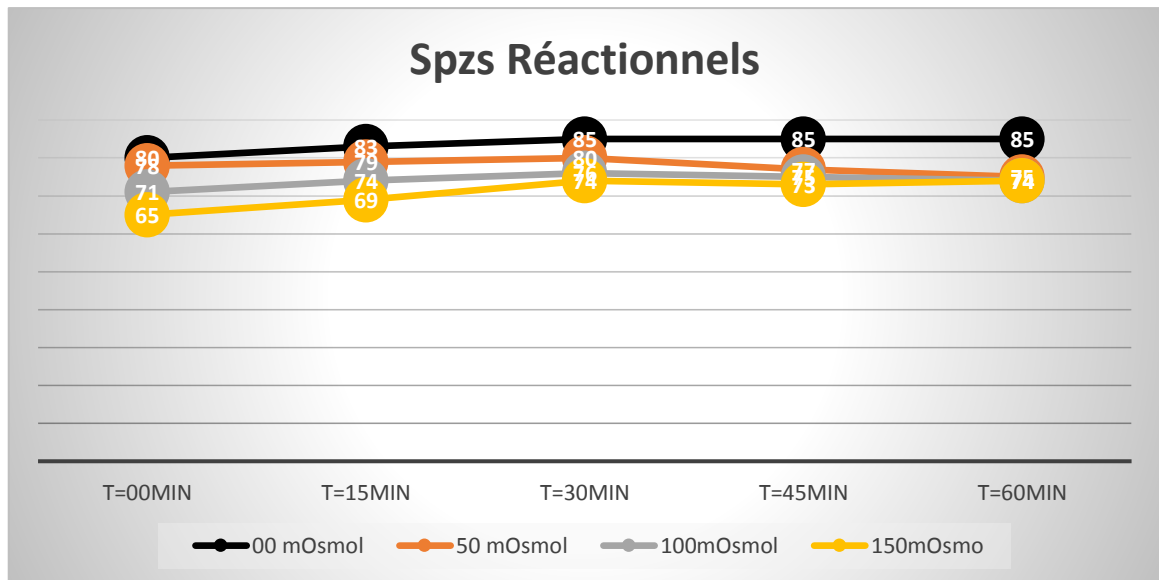


Tableau n°10 : Réactions des Spz de l'Ejaculat 01 du chien Esko

	00 mOsmol	50 mOsmol	100 mOsmol	150 mOsmol
T= 00 min	Spz Réact : 78% Spz Non Réact : 22%	Spz Réact : 71% Spz Non Réact : 29%	Spz Réact : 64% Spz Non Réact : 36%	Spz Réact : 57% Spz Non Réact : 43%
T= 15 min	Spz Réact : 81% Spz Non Réact : 19%	Spz Réact : 74% Spz Non Réact : 26%	Spz Réact : 66% Spz Non Réact : 34%	Spz Réact : 60% Spz Non Réact : 40%
T= 30 min	Spz Réact : 83% Spz Non Réact : 17%	Spz Réact : 79% Spz Non Réact : 21%	Spz Réact : 70% Spz Non Réact : 30%	Spz Réact : 65% Spz Non Réact : 35%
T= 45 min	Spz Réact : 82% Spz Non Réact : 18%	Spz Réact : 78% Spz Non Réact : 22%	Spz Réact : 70% Spz Non Réact : 30%	Spz Réact : 63% Spz Non Réact : 37%
T= 60 min	Spz Réact : 82% Spz Non Réact : 18%	Spz Réact : 77% Spz Non Réact : 23%	Spz Réact : 69% Spz Non Réact : 31%	Spz Réact : 64% Spz Non Réact : 36%

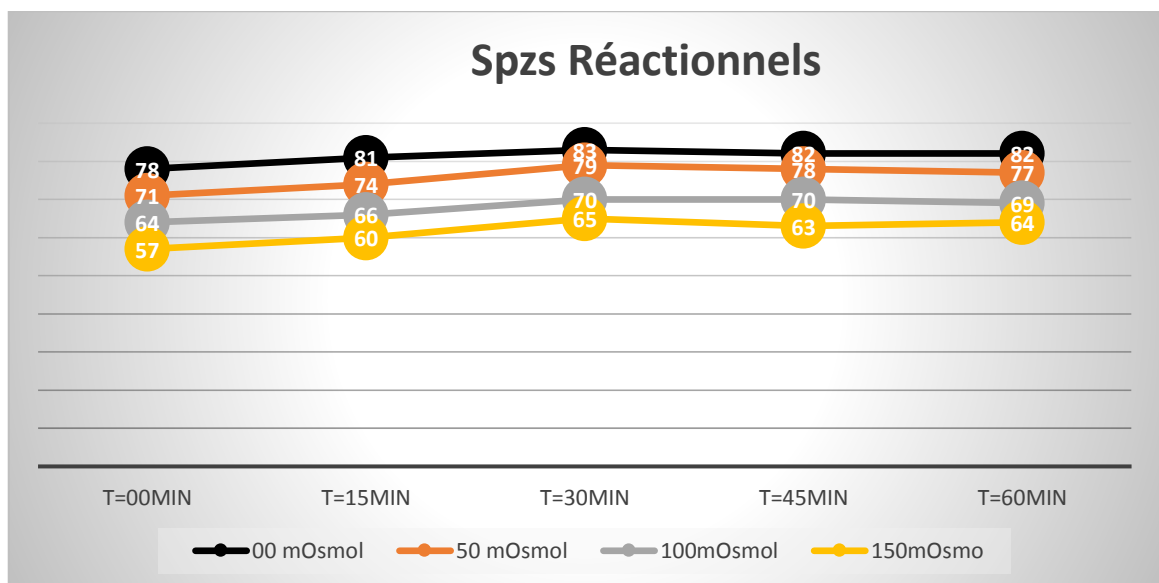


Tableau n°11 : Réactions des Spz de l'Ejaculat 01 du chien Wellis

	00 mOsmol	50 mOsmol	100 mOsmol	150 mOsmol
T= 00 min	Spz Réact : 72% Spz Non Réact : 28%	Spz Réact : 67% Spz Non Réact : 33%	Spz Réact : 62% Spz Non Réact : 38%	Spz Réact : 56% Spz Non Réact : 44%
T= 15 min	Spz Réact : 74% Spz Non Réact : 26%	Spz Réact : 69% Spz Non Réact : 31%	Spz Réact : 65% Spz Non Réact : 35%	Spz Réact : 58% Spz Non Réact : 42%
T= 30 min	Spz Réact : 77% Spz Non Réact : 23%	Spz Réact : 74% Spz Non Réact : 26%	Spz Réact : 68% Spz Non Réact : 32%	Spz Réact : 62% Spz Non Réact : 38%
T= 45 min	Spz Réact : 75% Spz Non Réact : 25%	Spz Réact : 74% Spz Non Réact : 26%	Spz Réact : 68% Spz Non Réact : 32%	Spz Réact : 61% Spz Non Réact : 39%
T= 60 min	Spz Réact : 77% Spz Non Réact : 23%	Spz Réact : 73% Spz Non Réact : 27%	Spz Réact : 67% Spz Non Réact : 33%	Spz Réact : 62% Spz Non Réact : 38%

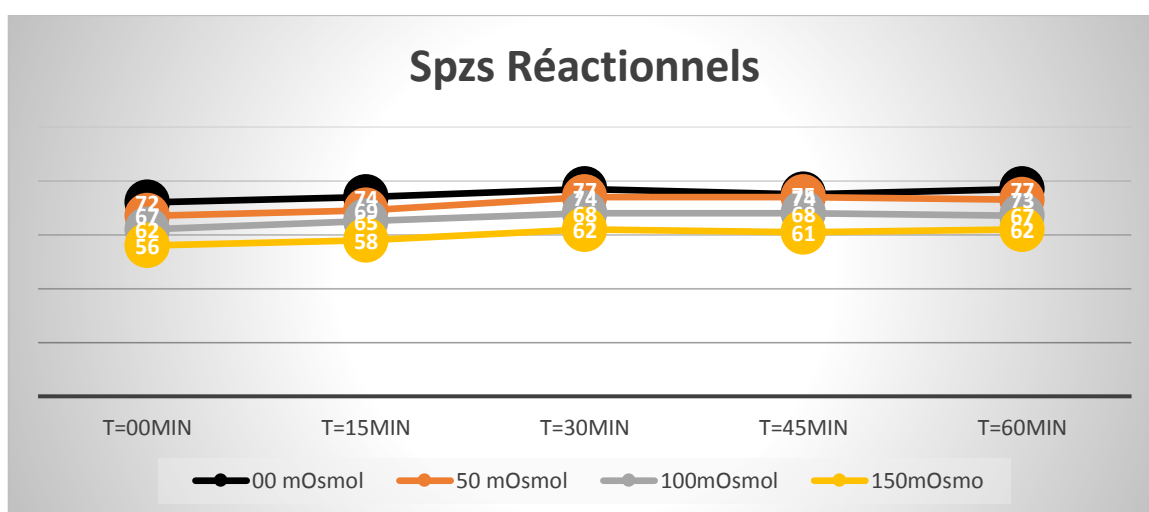


Tableau n°12 : Réactions des Spz de l'Ejaculat 02 du chien Wellis

	00 mOsmol	50 mOsmol	100 mOsmol	150 mOsmol
T= 00 min	Spz Réact : 75% Spz Non Réact : 25%	Spz Réact : 69% Spz Non Réact : 31%	Spz Réact : 62% Spz Non Réact : 38%	Spz Réact : 56% Spz Non Réact : 44%
T= 15 min	Spz Réact : 79% Spz Non Réact : 21%	Spz Réact : 72% Spz Non Réact : 28%	Spz Réact : 66% Spz Non Réact : 34%	Spz Réact : 60% Spz Non Réact : 40%
T= 30 min	Spz Réact : 83% Spz Non Réact : 17%	Spz Réact : 75% Spz Non Réact : 25%	Spz Réact : 71% Spz Non Réact : 29%	Spz Réact : 65% Spz Non Réact : 35%
T= 45 min	Spz Réact : 82% Spz Non Réact : 18%	Spz Réact : 75% Spz Non Réact : 25%	Spz Réact : 71% Spz Non Réact : 29%	Spz Réact : 63% Spz Non Réact : 37%
T= 60 min	Spz Réact : 82% Spz Non Réact : 18%	Spz Réact : 74% Spz Non Réact : 26%	Spz Réact : 71% Spz Non Réact : 29%	Spz Réact : 64% Spz Non Réact : 36%

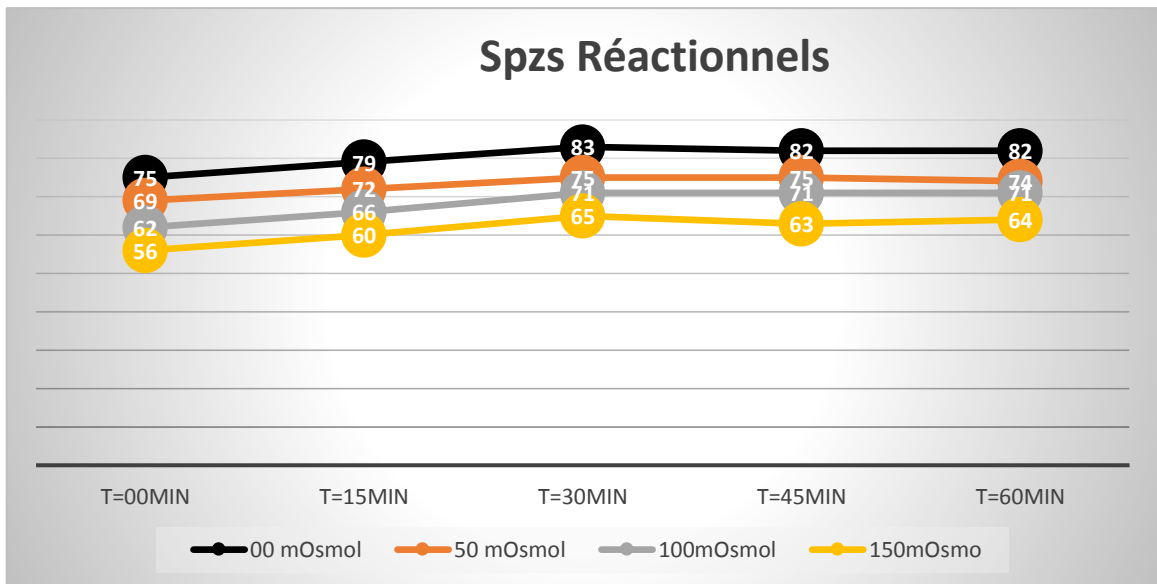


Tableau n°13 : Réactions des Spz de l'Ejaculat 03 du chien Wellis

	00 mOsmol	50 mOsmol	100 mOsmol	150 mOsmol
T= 00 min	Spz Réact : 83% Spz Non Réact : 17%	Spz Réact : 77% Spz Non Réact : 23%	Spz Réact : 72% Spz Non Réact : 28%	Spz Réact : 65% Spz Non Réact : 35%
T= 15 min	Spz Réact : 85% Spz Non Réact : 15%	Spz Réact : 80% Spz Non Réact : 20%	Spz Réact : 76% Spz Non Réact : 24%	Spz Réact : 69% Spz Non Réact : 31%
T= 30 min	Spz Réact : 88% Spz Non Réact : 12%	Spz Réact : 84% Spz Non Réact : 16%	Spz Réact : 79% Spz Non Réact : 21%	Spz Réact : 75% Spz Non Réact : 25%
T= 45 min	Spz Réact : 88% Spz Non Réact : 12%	Spz Réact : 83% Spz Non Réact : 17%	Spz Réact : 78% Spz Non Réact : 22%	Spz Réact : 75% Spz Non Réact : 25%
T= 60 min	Spz Réact : 89% Spz Non Réact : 11%	Spz Réact : 84% Spz Non Réact : 16%	Spz Réact : 79% Spz Non Réact : 21%	Spz Réact : 75% Spz Non Réact : 25%

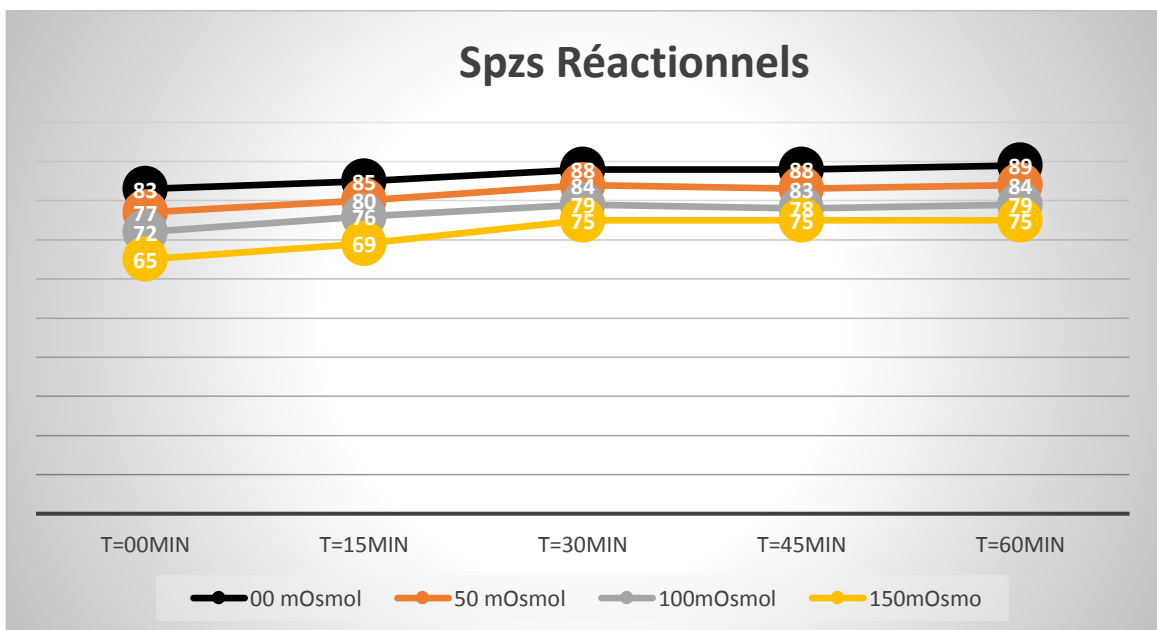


Tableau n°14 : Réactions des Spz de l'Ejaculat 01 du chien Enzo

	00 mOsmol	50 mOsmol	100 mOsmol	150 mOsmol
T= 00 min	Spz Réact : 68% Spz Non Réact : 32%	Spz Réact : 64% Spz Non Réact : 36%	Spz Réact : 59% Spz Non Réact : 41%	Spz Réact : 51% Spz Non Réact : 49%
T= 15 min	Spz Réact : 71% Spz Non Réact : 29%	Spz Réact : 68% Spz Non Réact : 31%	Spz Réact : 61% Spz Non Réact : 39%	Spz Réact : 56% Spz Non Réact : 44%
T= 30 min	Spz Réact : 74% Spz Non Réact : 26%	Spz Réact : 72% Spz Non Réact : 28%	Spz Réact : 65% Spz Non Réact : 35%	Spz Réact : 62% Spz Non Réact : 38%
T= 45 min	Spz Réact : 75% Spz Non Réact : 25%	Spz Réact : 71% Spz Non Réact : 29%	Spz Réact : 65% Spz Non Réact : 35%	Spz Réact : 61% Spz Non Réact : 39%
T= 60 min	Spz Réact : 75% Spz Non Réact : 25%	Spz Réact : 72% Spz Non Réact : 28%	Spz Réact : 64% Spz Non Réact : 36%	Spz Réact : 62% Spz Non Réact : 38%

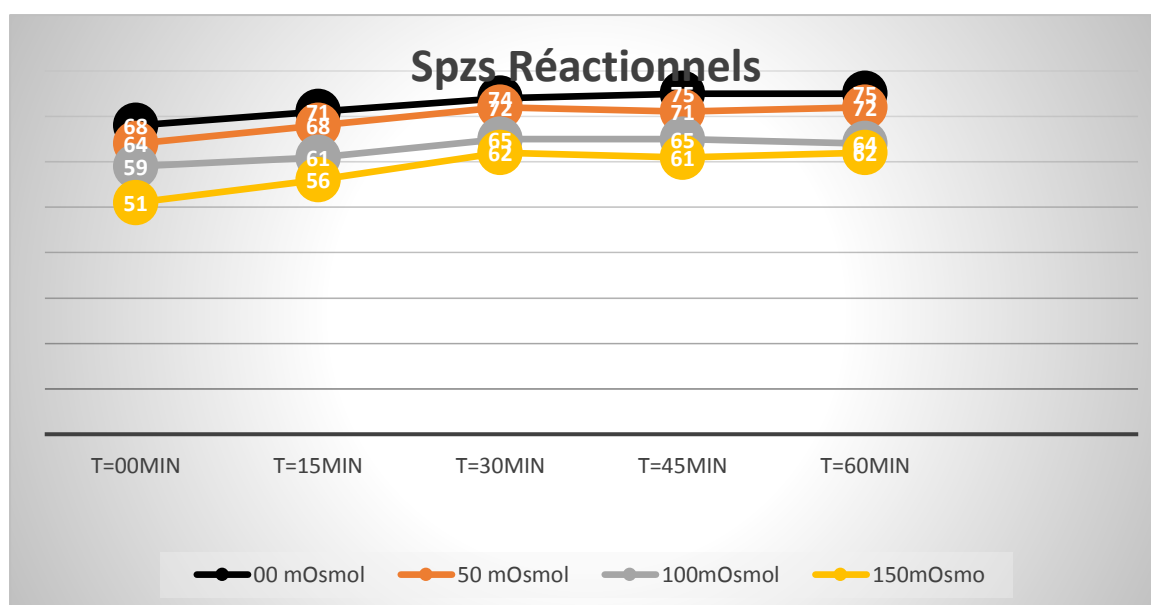


Tableau n°15 : Réactions des Spz de l'Ejaculat 02 du chien Enzo

	00 mOsmol	50 mOsmol	100 mOsmol	150 mOsmol
T= 00 min	Spz Réact : 80% Spz Non Réact : 20%	Spz Réact : 75% Spz Non Réact : 25%	Spz Réact : 71% Spz Non Réact : 29%	Spz Réact : 65% Spz Non Réact : 35%
T= 15 min	Spz Réact : 83% Spz Non Réact : 17%	Spz Réact : 77% Spz Non Réact : 23%	Spz Réact : 74% Spz Non Réact : 26%	Spz Réact : 69% Spz Non Réact : 31%
T= 30 min	Spz Réact : 85% Spz Non Réact : 15%	Spz Réact : 80% Spz Non Réact : 20%	Spz Réact : 76% Spz Non Réact : 24%	Spz Réact : 74% Spz Non Réact : 26%
T= 45 min	Spz Réact : 85% Spz Non Réact : 15%	Spz Réact : 79% Spz Non Réact : 21%	Spz Réact : 75% Spz Non Réact : 25%	Spz Réact : 73% Spz Non Réact : 27%
T= 60 min	Spz Réact : 85% Spz Non Réact : 15%	Spz Réact : 78% Spz Non Réact : 22%	Spz Réact : 74% Spz Non Réact : 26%	Spz Réact : 74% Spz Non Réact : 26%

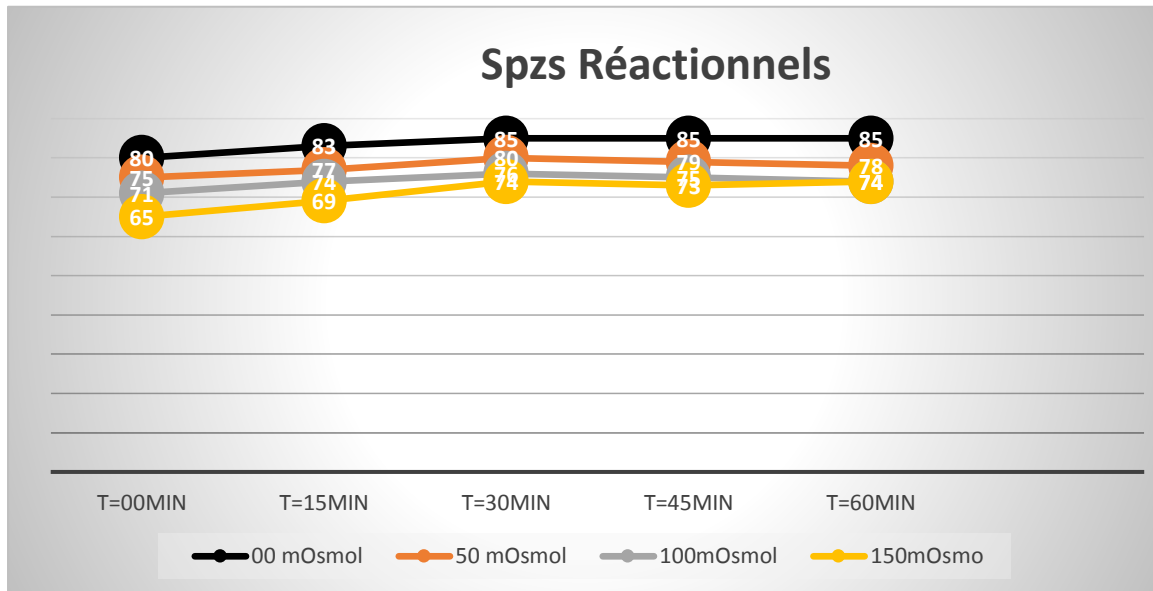
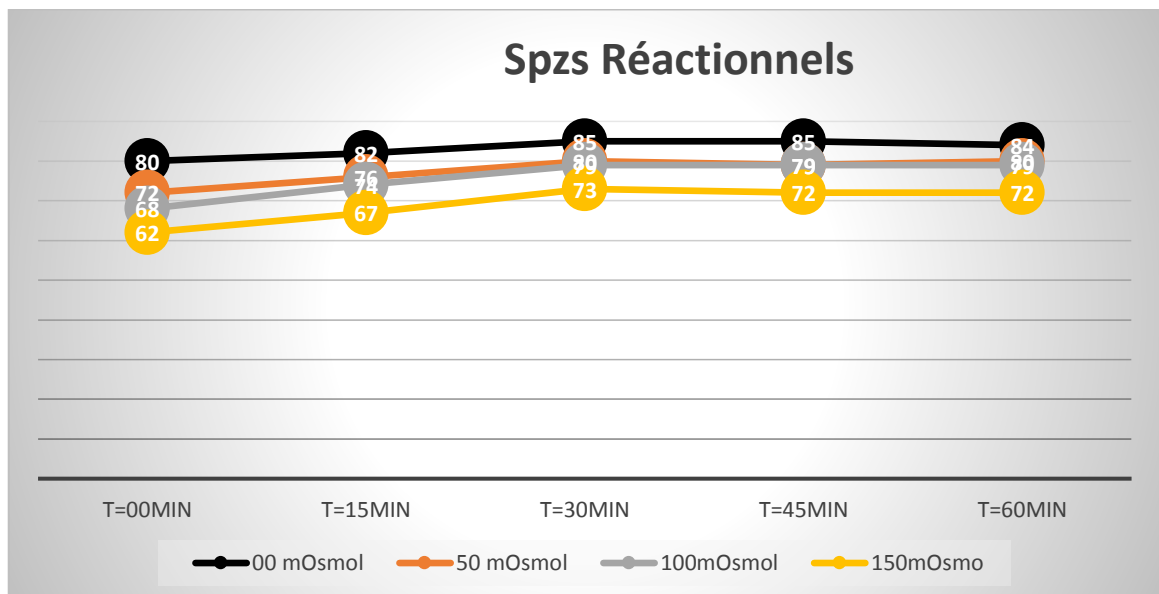


Tableau n°16 : Réactions des Spz de l'Ejaculat 03 du chien Enzo

	00 mOsmol	50 mOsmol	100 mOsmol	150 mOsmol
T= 00 min	Spz Réact : 80% Spz Non Réact : 20%	Spz Réact : 72% Spz Non Réact : 28%	Spz Réact : 68% Spz Non Réact : 32%	Spz Réact : 62% Spz Non Réact : 37%
T= 15 min	Spz Réact : 82% Spz Non Réact : 18%	Spz Réact : 76% Spz Non Réact : 24%	Spz Réact : 74% Spz Non Réact : 26%	Spz Réact : 67% Spz Non Réact : 33%
T= 30 min	Spz Réact : 85% Spz Non Réact : 15%	Spz Réact : 80% Spz Non Réact : 20%	Spz Réact : 79% Spz Non Réact : 21%	Spz Réact : 73% Spz Non Réact : 27%
T= 45 min	Spz Réact : 85% Spz Non Réact : 15%	Spz Réact : 79% Spz Non Réact : 21%	Spz Réact : 79% Spz Non Réact : 21%	Spz Réact : 72% Spz Non Réact : 28%
T= 60 min	Spz Réact : 84% Spz Non Réact : 16%	Spz Réact : 80% Spz Non Réact : 20%	Spz Réact : 79% Spz Non Réact : 21%	Spz Réact : 72% Spz Non Réact : 28%



III. DISCUSSION

Dans une première partie, nous discuterons de l'influence des deux facteurs étudiés sur les résultats du test du Gonflement HYPO-OSMOTIQUE puis nous déterminerons le duo optimal de ces deux facteurs, enfin nous ferons une autocritique de notre travail.

A. Influence des deux facteurs.

1. Influence de l'osmolarité :

L'osmolarité 0mOsmol:

On voit que le nombre de spermatozoïdes réactionnelles est pré de la totalité des Spermatozoïdes vivant dans chaque récolte.

L'osmolarité 50mOsmol:

On voit que le nombre des spermatozoïdes a diminué par rapport au milieu précédent (00mOsmol).

L'osmolarité 100mOsmol:

On voit que le nombre des spermatozoïdes réactionnelles a diminué en comparant avec les deux milieux précédents.

L'osmolarité 150 mOsmol:

On voit que le nombre des spermatozoïdes réactionnelles dans ce milieu est le plus petit dans toutes les récoltes.

En résumé, on constate que plus le milieu est hypo-osmotique, plus le nombre de spermatozoïdes réactionnels augmente.

2. Influence du temps d'incubation :

Le test immédiat (sans incubation):

On voit dans tous les milieux que le nombre des spermatozoïdes réactionnelles est diminué par rapport à celui après incubation .

Le temps d'incubation de 15mn:

On voit dans tous les milieux que le nombre des spermatozoïdes réactionnelles est plus grand, comparant avec le teste sans incubation, mais il reste plus petit que celui après incubation de 30 min.

Le temps d'incubation de 30mn:

On voit dans tous les milieux que le nombre des spermatozoïdes réactionnelles est plus élevé que celui après incubation de 15 min ou de sans incubation.

Le temps d'incubation de 45mn:

On voit dans tous les milieux que le nombre des spermatozoïdes réactionnelles est constant en le comparant avec celui après incubation de 30 min.

Le temps d'incubation de 60mn:

On voit dans tous les milieux que le nombre des spermatozoïdes réactionnelles est constant en le comparant avec celui après incubation de 30 min et 45 min.

En résumé on constate que le nombre de spermatozoïdes réactionnels augmente de (T=00) min jusqu'à (T=30 min) puis il prend une valeur constante après (T=30 min).

B. Le Duo Optimal des deux facteurs :

Nos résultats semblent indiquer que le Duo Optimale pour faire le test d'intégrité membranaire flagellaire est de choisir une solution Hypo-Osmotique de 50 mOsmol est incubation pendant 30 min.

C. Autocritique de notre travail.

1. Le prélèvement.

Nos résultats sont à moduler du fait de l'utilisation de 5 différents chiens pour la réalisation de notre expérience, et aussi, les chiens n'étaient pas dans des conditions favorables qui a affecté sur la qualité de la semence.

2. Le protocole

Il aurait été préférable dans notre étude de comparer plusieurs compositions de la solution hypo-osmotique. Cependant, notre étude consiste en un factoriel 4x5 (temps d'incubation * Osmolarité). Sur un plan pratique, Il est très contraignant dans le protocole de faire varier un troisième paramètre (composition de la solution HO) dans notre présente étude.

Nous ne pouvons donc pas conclure sur l'influence de la composition de la solution Hypo-Osmotique sur le test, Il serait donc opportun d'effectuer d'autres expérimentations à partir de nos résultats et de comparer différentes compositions de la solution HO.

Conclusion

Le test de gonflement Hypo-Osmotique (HOSt) est un test qui permet d'évaluer l'intégrité membranaire des cellules. De Nombreux test sont fait mais avec les mêmes facteurs.

Notre travail a pour objectif de simplifier ce test en diminuant le temps d'incubation(60min) à 37°C et en remplaçant la solution hypo-osmotique préparée au laboratoire par une dilution du soluté de perfusion salé à 0.9% du commerce ayant la même osmolarité. L'intérêt est de pouvoir intégrer le test hypo-osmotique simplifié dans le cadre d'un spermogramme rapide réalisable dans les conditions de la clientèle de reproduction canine.

Nous avons récolté treize (13) éjaculats à partir de cinq (05) chiens différents. Après évaluation initiale de chaque éjaculat, une série de tests hypo-osmotiques a été lancée avec quatre osmolarités différentes (0mOsmol, 50mOsmol, 100mOsmol, 150mOsmol) et cinq (05) temps d'incubation différents (0mn, 15mn, 30mn, 45mn, 60mn).

Nos résultats semblent indiquer que l'incubation des spermatozoïdes à 37°C pendant 30 min dans une solution de 50 mOsmol obtenue par dilution (1 :5) du soluté de perfusion salé isotonique du commerce donne un résultat comparable au protocole de référence (60mn * 100mOsmol ; solution HO préparée au laboratoire à base de fructose et de citrates de Na).

Nous ne pouvons pas conclure sur l'influence de la composition de la solution Hypo-Osmotique sur le test, Il serait donc opportun d'effectuer d'autres expérimentations avant de prendre ce duo (50mOsmol – 30 min) et l'intégrer dans le spermogramme de routine.

BIBLIOGRAPHIE

BARONE R. (1978)

Anatomie comparée des mammifères domestiques. Tome 3. Splanchnologie. Fascicule 2. Appareil uro-génital, fœtus et ses annexes, péritoine et topographie abdominale. Première édition. Vigot, Paris, 951 pp.

COLLIN B. (2003)

Anatomie du chien.

Edition Derouaux Ordina, Liège, 562 pp

DADOUNE J.-P., HADJISKY P., SIFFROI J.-P., VENDRELY E. (1990)

Appareil de reproduction masculin.

In : Histologie. Collection « de la biologie à la clinique ». Flammarion Médecine Science, Paris.

DUFOUR H. (1998)

Validation du test hypo-osmotique dans l'espèce canine.

Thèse de doctorat vétérinaire, Université Claude-Bernard, Lyon, 70 pp.

ENGLAND G.C.W. (1999)

Semen quality in dogs and the influence of a short-interval second ejaculation.

Theriogenology, 52, 981-986

ENGLAND G.C.W., PLUMMER J.M. (1993)

Hypo-osmotic swelling of dog spermatozoa.

J. Reprod. Fert. Suppl., 47, 261-270.

FONTBONNE A. (1992)

Physiologie sexuelle du chien mâle.

In : Pages J.P. (eds.). Les indispensables de l'animal de compagnie. Reproduction du chien et du chat. PMCAC Edition, Paris, 19-26.

FONTBONNE A., BUFF S., GARNIER F. (2000)

Données récentes en physiologie et endocrinologie sexuelles dans l'espèce canine.

Le point vétérinaire, 31, 209, 27-32.

FONTBONNE A., DUMONT C. (1992)

Prélèvement et examen de la semence chez le chien.

In : Pages J.P. (eds.). Les indispensables de l'animal de compagnie. Reproduction du chien et du chat. PMCAC Edition, Paris, 251-260.

FRESHMAN J.L. (2002)

Semen collection and evaluation.

Clin. Tech. Small Anim. Pract., 17, 3, 104-107.

GUERIN V. (1997)

Contribution à l'évaluation du pouvoir fécondant du sperme de chien.

Emploi d'un colorant de l'acrosome : le Spermac®.

Thèse de doctorat vétérinaire, Université Claude-Bernard, Lyon, 95 pp.

HISHINUMA M., SEKINE J. (2003)

Evaluation of membrane integrity of canine epididymal spermatozoa by short hypoosmotic swelling test with ultrapure water.

J. Vet. Med. Sci., 65, 7, 817-820.

KUMI-DIAKA J. (1993)

Subjecting canine semen to the hypo-osmotic test.

Theriogenology, 39,6, 1279-1289.

KUMI-DIAKA J., BADTRAM G. (1994)

Effect of storage on sperm membrane integrity and other functional characteristics of canine spermatozoa: in vitro bioassay for canine semen.

Theriogenology, 41, 7, 1355-1366.

KUTZLER M.A. (2005)

Semen collection in the dog.

Theriogenology, 64, 747-754.

MIALOT J.-P. (1984)

Pathologie de la reproduction chez les carnivores domestiques.

Edition du point vétérinaire, Maisons-Alfort.

OETTLE E.E. (1993)

Sperm morphology and fertility in the dog.

J. Reprod. Fert. Suppl., 47, 257-260.

RODRIGUEZ- GIL J.E., MONTSERRAT A., RIGAU T. (1994)

Effects of hypoosmotic incubation on acrosome and tail structure on canine spermatozoa.

Theriogenology, 42, 815-829.

RODRIGUEZ-MARTINEZ H. (2007)

State of the art in farm animal sperm evaluation.

Reprod., Fert. and dev., 19, 91-101.

MILLETTE C.F. (1998)

Spermatozoa.

In : Knobil E., Neill J.D. (eds.). Encyclopedia of reproduction. Volume 4.

Academic press, San Diego, 586-596.

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Liste des Figures :

Figure n° 1 : L'appareil génital mâle.....	14
Figure n° 2 : Les trois phases de l'éjaculat du chien.....	15
Figure n° 3 : Matériel nécessaire à la récolte du sperme chez le chien.....	18
Figure n° 4 : Principales anomalies morphologiques majeures et mineures.....	24
Figure n° 5 : Réalisation du test hypo-osmotique.....	24
Figure n° 6 : Spermatozoïdes soumis au test hypo-osmotique.....	25
Figure n° 6 : Figure n°7 : Etuve utilisé pour l'incubation des solutions préparés..	31

Liste Des Tableaux :

Tableau n°1 : Description des trois phases de l'éjaculat du chien.....	15
Tableau n°2 : Préparation des solutions Hypo-Osmotiques.....	30
Tableau n°3 : Caractéristiques de la semence Fraiche.....	32
Tableau n°4 : Réactions des Spz de l'Ejaculat 01 du chien Eric.....	32
Tableau n°5 : Réactions des Spz de l'Ejaculat 02 du chien Eric.....	33
Tableau n°6 : Réactions des Spz de l'Ejaculat 01 du chien Sam.....	33
Tableau n°7 : Réactions des Spz de l'Ejaculat 02 du chien Sam.....	34
Tableau n°8 : Réactions des Spz de l'Ejaculat 03 du chien Sam.....	35
Tableau n°9 : Réactions des Spz de l'Ejaculat 04 du chien Sam.....	35
Tableau n°10 : Réactions des Spz de l'Ejaculat 01 du chien Esko.....	36
Tableau n°11 : Réactions des Spz de l'Ejaculat 01 du chien Wellis.....	37
Tableau n°12 : Réactions des Spz de l'Ejaculat 02 du chien Wellis.....	37
Tableau n°13 : Réactions des Spz de l'Ejaculat 03 du chien Wellis.....	38
Tableau n°14 : Réactions des Spz de l'Ejaculat 01 du chien Enzo.....	39
Tableau n°15 : Réactions des Spz de l'Ejaculat 02 du chien Enzo.....	39
Tableau n°16 : Réactions des Spz de l'Ejaculat 03 du chien Enzo.....	40