



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la
Recherche Scientifique
جامعة البليدة 1
Université Blida 1



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biotechnologies et Agro-Ecologie

Mémoire

En vue de l'obtention du Diplôme d'un Master Académique

Option

Biotechnologie et Pathologie Moléculaire

Thème

**Etude de la vitalité et de la cinétique des
spermatozoïdes canins sous différents temps de
réfrigération.**

Présenté par M. Benkeddada rayane.

M. Fellah fatima.

Devant le Jury :

<i>Mme Bokreta.S</i>	<i>GRADE MAA</i>	<i>SNV, Blida1</i>	<i>Présidente</i>
<i>Mme Benazouz .F</i>	<i>GRADE MAA</i>	<i>SNV, Blida1</i>	<i>Examinatrice</i>
<i>Mme Djazouli Alim.Z</i>	<i>GRADE Professeure</i>	<i>SNV, Blida1</i>	<i>Promotrice</i>
<i>Dr Belala.R</i>	<i>GRADE MCA</i>	<i>SNV. Blida 1</i>	<i>Co-Promoteur</i>

Session 2021/ 2022.

Dédicaces

J'ai le grand plaisir de dédier ce modeste travail :

A ma très chère mère

Quoi que je fasse ou que je dise, je ne saurai point te remercier comme il se doit .Ton affection me couvre, ta bienveillance me guide et ta présence à mes côtés a toujours été ma source de force pour affronter les différents obstacles.

A mon très cher père

Pour toutes les fois où tu as essuyé mes larmes, où tu as soigné mes bobos, où tu m'as câliné tendrement. Pour toutes les leçons que tu m'as apprises, pour les sourires que tu m'as offerts, pour les chagrins que tu as transformés en rires, je te remercie infiniment.

Et je t'aime tout autant papa.

A mon très cher frère et mes chères sœurs

Le rôle que vous avez joué dans ma vie est incommensurable. Je vous remercie pour toute votre aide et votre soutien continu.

Que Dieu vous donne la santé, le bonheur, le courage et par-dessus tout le succès..

A ma chère binôme Rayane

Merci de m'offrir le support dont j'ai besoin quand ça ne va pas. Merci pour ton écoute, pour tes conseils et pour cette amitié qui est si facile entre nous. Merci pour la confiance et pour les confidences qu'on s'échange.

A ma chère famille

A tous les membres de ma famille qui m'a toujours soutenue et toute personne qui porte le nom **Fellah**.

Fellah fatima.

Avec l'expression de ma reconnaissance, je dédie ce modeste travail a ceux qui, quels que soient les termes embrassés, je n'arriverais jamais à leur exprimer mon amour sincère.

A mes chers parents qui ont été toujours à mes côtés et m'ont toujours soutenu tout au long de ces longues années d'études, votre amour a fait de moi ce que je suis aujourd'hui, chaque ligne de cette thèse vous exprime la reconnaissance et le merci d'être mes parents.

A mon petit frère Fawzi et ma petite sœur Ibtihel, je suis fière de vous avoir dans ma vie et je vous souhaite une vie pleine de santé et de succès, je vous aime, qu'Allah nous garde l'un pour l'autre.

A Sofia et Yousra, mes meilleures amies, vous êtes pour moi des sœurs et des amies sur qui je peux compter. En témoignage de l'amitié qui nous unit et des souvenirs de tous les moments que nous avons passés ensemble, je vous dédie ce travail et je vous souhaite une vie pleine de santé et de bonheur.

A mon Ricco, le plus beau cadeau que dieu m'a offert dans cette vie.

A la mémoire de mes grands-pères Ibrahim et Mohamed j'aurais souhaité votre présence en ce moment, vous m'avez toujours fait preuve d'amour et d'affection. Vous êtes toujours présents dans mon esprit et dans mon cœur. Que dieu vous accueille dans son vaste paradis.

A mes grands-mères Khadîdja et Nadjia je vous dédie cette thèse pour vos prières et votre amour inconditionnel. Merci pour tout et que dieu vous donne bonne santé et longue vie parmi nous je vous aime énormément.

A mes tantes et oncles paternelles Fatiha, Radia, Yasmina, Zineb, Fethi, Smail et Mahrez.

A mes tantes et oncles maternels Samir, Karima et Naziha.

A mon cher cousin Djilali merci pour tout le soutien et les conseils que dieu te protège.

A mes chers cousins et cousines. Je vous dédie ce travail en reconnaissance de l'amour que vous m'offrez quotidiennement et votre bonté exceptionnelle. Que Dieu le Tout Puissant vous garde et vous procure santé et bonheur.

A mon binôme Fatima. Je remercie dieu de t'avoir rencontré, tu es une personne en or merci pour tout, ton soutien, ton aide, ton écoute et je te souhaite une vie pleine de santé, bonheur et réussite.

Benkeddada rayane.

Remerciements

Avant toute chose, On remercie Dieu, le tout puissant, pour nous avoir donnés la force, la patience, et la volonté pour achever ce modeste travail.

Nos remerciements les plus sincères,

A notre promotrice **Mme Djazouli. Alim** pour l'aide qu'elle nous a apportée, pour sa rigueur, sa patience et pour ses grandes qualités humaines, qui nous a été très précieuse. Le fait de nous enseigner durant notre cursus est bien une chance pour nous, vous nous faites l'honneur de diriger ce travail de thèse.

A notre Co-promoteur **Mr Belala.R**, On vous remercie monsieur de nous avoir accueillies dans la plateforme biotechnologique en reproduction des carnivores et pour nous avoir donné l'accès aux équipements de recherche et matériels de laboratoire nécessaires à la réalisation de ce travail. Votre pédagogie et votre patience ont rendu notre pratique très passionnante.

A **Mme Bokreta.S** qui a fait l'honneur de présider notre jury de thèse.

A **Mme Benazouz.F** qui a fait l'honneur d'être examinatrice de ce travail.

A **Dr. Medjkoune.M**, On vous remercie pour tous tes efforts, ta patience et ton soutien. On vous souhaite une bonne continuation.

On remercie également nos professeures pour la qualité de l'enseignement qu'ils nous ont prodigué au cours de ces années passées à l'université de Saad Dahlab.

Enfin nos vifs remerciements vont également à toutes les personnes qui nous ont soutenus moralement, ainsi qu'à tous ceux qui ont contribué de près et de loin à la réalisation de ce travail.

Table des matières

Liste d'illustration	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Introduction	1
Chapitre I : données bibliographiques	
I. Généralité sur la biotechnologie de reproduction.....	3
II. Méthodes biotechnologiques pour la conservation de biospécimens en reproduction.....	4
II.1. La cryoconservation	4
II.2. Conservation par réfrigération.....	4
III. Semence canine et caractéristiques physiques.....	4
III.1. Caractéristiques générales de la semence canine.....	4
III.2. Composition de la semence canine.....	6
IV. Méthode de collecte de la semence canine.....	9
IV.1. Récolte de la semence canine.....	9
V. Evaluation de la qualité de la semence.....	10
V.1. Les méthodes conventionnelles.....	11
V.2. Les méthodes non conventionnelles.....	18
VI. Facteurs intrinsèques et extrinsèques influençant la qualité de semence.....	24
VI.1. Facteurs liés à l'animal.....	24
VI.2. Facteurs liés au prélèvement.....	25
VI.3. Facteurs liés à la conservation.....	25
VII. La réfrigération de la semence canine.....	26
VII.1. L'intérêt de l'utilisation de la semence congelée.....	26
VII.2. Condition d'utilisation de la semence : Dilution caractéristiques du dilueur..	26
Chapitre II : Matériel et méthodes	
I. Lieu et durée de la réalisation de la partie expérimentale.....	27
II. Modèle biologique.....	27

III. Récole de la semence.....	27
IV. Intervalles d'évaluation de la semence.....	28
V. Méthodes conventionnelles.....	28
V.1. Le Volume.....	28
V.2. La mobilité.....	29
V.3. Mesure de la concentration des spermatozoïdes par le photomètre.....	30
V.4. Evaluation e la vitalité.....	31
VI. Méthodes non conventionnelles.....	34
VI.1. Analyse par le CASA.....	34
VI.2. Analyses par cytométrie en flux.....	35
VII. Méthodes de réfrigération.....	37
Chapitre III : Résultats	
I. Analyse de la variance entre des paramètres.....	39
I.1. Analyse de la variance de la motilité massale et individuelle.....	39
I.2. Analyse de la variance de la vitalité.....	40
I.3. Analyse de la variance du type de motilité.....	41
I.4. Analyse de la variance de l'amplitude du déplacement latérale de la tête et la fréquence de croisement des battements.....	42
I.5. Analyse de la variance de la morphologie du flagelle	43
Chapitre IV : Discussion.....	45
Conclusion.....	47
Références bibliographiques	
Annexes	

Liste des figures

Figure.01 : Les trois phases de l'éjaculat du chien (BRIFFAUT, (2007).....	5
Figure.02 : Structure schématique du spermatozoïde (Mariana,2006).....	8
Figure.03 : la pièce intermédiaire et principale du spermatozoïdes (Fribroug et al.,2005).....	8
Figure.04 : Matériel nécessaire à la récolte du sperme chez le chien (Fontbonne,1992).....	9
Figure.05 : Chambre de l'hémocytomètre pour la numération des spermatozoïdes.....	13
Figure.06 . Les spermatozoïdes comptés dans les carrés de la grille.....	14
Figure.07 : Exemple de coloration obtenue au microscope avec la coloration éosine-nigrosine d'après le laboratoire (Fertipron, 2016).....	15
Figure.08 : Représentation schématique des changements morphologiques typiques des spermatozoïdes humains soumis à un stress hypo-osmotique (WHO, 2021).....	16
Figure.09 : Photomicroscopies sous microscope à contraste de phase de spermatozoïdes soumis à un stress hypo-osmotique. (Holmes, 2020).....	16
Figure.10 : Schéma des principales anomalies majeures et mineures (OTT et al.,1987).....	18
Figure.11 :Schéma démontrant le principe de la cytométrie en flux (TourrelCuzin,2012)....	19
Figure.12 : Les différents systèmes intervenants dans le cytomètre en flux.....	19
Figure.13 : Interaction de la lumière avec la cellule (University of Aberdeen, 2010).....	20
Figure.14 : Exemples de graphiques au cymomètre en flux concernant l'intégrité des spermatozoïdes. Coloration SYBR 14 et iodure de présidium (PI). Spermatozoïdes rouges morts dont l'intégrité de la membrane cellulaire est altérée ; spermatozoïdes jaunes-doubles positifs commençant à perdre l'intégrité de la membrane cellulaire ; spermatozoïdes verts-viables dont l'intégrité cellulaire est intacte ; débris ou fragments de spermatozoïdes brisés bleus. (Yan et al., 2019).....	21
Figure.15 : Analyseur Spermatique assistée par ordinateur, CASA, Hamillton Thorn IVOS II (Talarczyk-Desol et al., 2017).....	22

Figure.16 : Image de la lame Leja utilisée pour une analyse par le système CASA. https://www.imv-technologies.com	23
Figure.17 : Terminologie standard pour les variables mesurées par les systèmes CASA. (Mortimer et Mortimer ,2021).....	24
Figure.18 : Identification des chiens utilisés dans l'étude (originale).....	27
Figure.19 : Réchauffement des tubes et des cônes en silicone dans l'étuve universelle à convexion naturelle UN110 – Memmert, Allemagne (originale).....	28
Figure.20 : Etapes de la récolte de la semance (originale).....	28
Figure.21 : Evaluation de la mobilité massale (originale).....	29
Figure.22 : Evaluation de la mobilité individuelle (originale).....	30
Figure.23 : Lecture de la concentration des spermatozoïdes sur photomètre (originale).....	30
Figure.24 : Etapes de coloration Eiosine-Nigrosine (originale).....	32
Figure.25 : Etapes de test hypo-osmotique (originale).....	33
Figure.26: Etapes d'analyse par le CASA (originale).....	34
Figure.27: Les différentes positions des tubes pour effectuer un lavage du cytomètre (originale).....	35
Figure.28: Mise de la plaque après 10 min d'incubation dans le cytomètre (originale).....	36
Figure.29: Ajustassions de position de puits (originale).....	36
Figure.30: Ecran du résultat à la fin de l'analyse (originale).....	37
Figure.31 : Etapes de réfrigération (originale).....	38
Figure.32: Analyse de la variance one way-ANOVA de la motilité massale et individuelle en fonction de différents intervalles de temps.....	39
Figure.33: Analyse de la variance one way-ANOVA de la vitalité en fonction des différents intervalles de temps.....	40
Figure.34: Analyse de la variance one way-ANOVA du type de motilité en fonction de différents intervalles de temps.....	41

Figure.35: Analyse de la variance one way-ANOVA de l'amplitude du déplacement latérale de la tête et la fréquence de croisement des battements aux différents intervalles de temps.....42

Figure. 36: Analyse de la variance one way-ANOVA de la morphologie du flagelle aux différents intervalles de temps.....43

Liste des tableaux

Tableau I : Description des trois phases de l'éjaculat du chien (Fontbonne, Dumont, 1992)	5
Tableau II : Notes attribuées aux éjaculats selon leur motilité massale (Rukundo, 2009)....	12
Tableau III : Notes attribuées aux éjaculats suivant leur motilité individuelle, dans une grille de notation de 0 à 5 (Rukund, 2009).....	12
Tableau IV : Classification des anomalies morphologiques de la semence selon l'OMS.....	17

Abréviation

ALH : Amplitude of Lateral Heat, amplitude de déplacement latéraux de la tête des spermatozoïdes, exprimé (μm).

BCF : Beat Cross Frequency, fréquence des rythmes de croisement des trajectoires du spermatozoïde (Hertz).

CASA : Computer- Assisted Sperm Analysis , analyse automatisée de sperme .

EB : Easy buffer.

IVOS : Integrated visual optical system.

LIN : Linearity, linéarité de la trajectoire du spermatozoïde (%).

SPZ: Spermatozoïde.

VAP : Average Path Velocity, vitesse selon la trajectoire moyenne du spermatozoïde ($\mu\text{m/s}$).

VCL : Curvilinear Velocity, vitesse curviligne, vitesse calculée sur la distance totale parcourue par le spermatozoïde ($\mu\text{m/s}$).

VSL : Straight-Line Velocity, vitesse moyenne de déplacement linéaire du spermatozoïde ($\mu\text{m/s}$).

WOB : Wobble, oscillation autour de la trajectoire moyenne du spermatozoïde.

Résumé

De nos jours l'insémination artificielle a pris une place importante dans le domaine de l'amélioration génétique des animaux d'élevage. En effet, plusieurs centres de production spécialisés s'occupent actuellement de la production de semences de différentes espèces. Dans les protocoles de production et de conservation de la semence, un contrôle doit être effectué à différents niveaux afin de garantir une semence de bonne qualité. Dans cette étude nous avons proposé d'étudier deux principaux paramètres permettant d'évaluer la qualité des semences canine : la viabilité et la cinétique des spermatozoïdes. Pour cela l'évaluation a été faite par deux méthodes, conventionnelles et non conventionnelles (La cryométrie en flux et le système CASA (analyse du sperme assisté par ordinateur)). L'étude a été menée sur une semence fraîche et une semence réfrigérée à 4°C pendant 2 jours, 4 jours et 6 jours, sur 03 chiens adultes de race BPM (Bergers Belges Malinois) : Fidel 3ans, Chopper 6ans et Fax 9ans. Dans le but de maîtriser toutes les étapes d'évaluation microscopique manuelles de la semence canine [motilité massale et progressive, concentration, vitalité (éosine-nigrosine), (HOS-Test)], et les étapes automatisés, En contrôlant l'effet de la réfrigération sur ses paramètres. Nos résultats ont montré la diminution des taux des paramètres mesurer des spermatozoïdes en fonction du temps de réfrigération (j0 à j6), bien que l'évaluation du sperme avec les méthodes conventionnelles sont considérée comme des méthodes de référence, les méthodes plus récentes, comme la cytométrie en flux et le système CASA, présentent une meilleure rentabilité grâce à leur facilité, leur rapidité et leur précision sauf qu'une meilleure maîtrise de l'utilisation est nécessaire afin d'obtenir des résultats fiables. De nombreuses études restent encore à réaliser afin d'améliorer l'efficacité des protocoles et les méthodes d'évaluation de la semence.

Mots Clés : semence canine, réfrigération, vitalité, cinétique, méthodes conventionnelles Cytométrie en flux, système CASA.

Summary

Nowadays, artificial insemination has taken an important place in the field of genetic improvement of livestock. In fact, several specialized production centers are currently involved in the production of seeds of different species. In the seed production and conservation protocols, a control must be carried out at different levels in order to guarantee a good quality seed. In this study we proposed to study two main parameters to evaluate the quality of canine seeds: viability and sperm kinetics. The evaluation was done by two methods, conventional and non-conventional (Flow Cryometry and CASA (Computer Assisted Semen Analysis)). The study was conducted on fresh semen and semen refrigerated at 4°C for 2 days, 4 days and 6 days, on 03 adult dogs of BPM breed (Belgian Shepherd Dogs): Fidel 3 years, Chopper 6 years and Fax 9 years. In order to master all the manual microscopic evaluation steps of the canine semen [mass and progressive motility, concentration, vitality (eosin-nigrosin), (HOS-Test)], and the automated steps, by controlling the effect of refrigeration on its parameters. Our results showed the decrease of the rates of the parameters measuring spermatozoa according to the time of refrigeration (d0 to d6), although the evaluation of sperm with the conventional methods are considered as reference methods, the more recent methods, as the flow cytometry and the CASA system, present a better profitability thanks to their facility, their speed and their precision except that a better mastery of the use is necessary in order to obtain reliable results. Many studies are still needed to improve the efficiency of the protocols and the methods of seed evaluation.

Keywords : canine semen, refrigeration, vitality, kinetics, conventional methods, flow cytometry, CASA system

ملخص

في الوقت الحاضر، أخذ التلقيح الاصطناعي مكاناً مهماً في مجال التحسين الوراثي للثروة الحيوانية. في الواقع، تشارك العديد من مراكز الإنتاج المتخصصة حالياً في إنتاج بذور أنواع مختلفة. في بروتوكولات إنتاج وتخزين السائل المنوي، يجب إجراء المراقبة على مستويات مختلفة لضمان جودة السائل المنوي. اقترحنا في هذه الدراسة دراسة عاملين رئيسيين يسمحان بتقييم جودة السائل المنوي للكلاب: قابلية الحيوانات المنوية وحركية الحيوانات المنوية. لهذا تم إجراء التقييم بطريقتين، تقليدية وغير تقليدية (قياس التدفق بالتبريد والنظام وتحليل الحيوانات المنوية بمساعدة الكمبيوتر). أجريت الدراسة على السائل المنوي الطازج والسائل المنوي المبرد عند 4 درجات مئوية لمدة يومين و 4 أيام و 6 أيام، على 03 كلاب بالغة من سلالة بي بي إم (الراعي البلجيكي مالنوي): فيدل 3 سنوات، تشوبر 6 سنوات وفاكس 9 سنة. من أجل إتقان جميع خطوات التقييم المجهرية اليدوية للسائل المنوي للكلاب الحركة التقدمية والكتلة والتركيز والحيوية والخطوات الآلية، من خلال التحكم في تأثير التبريد على معاملاته. أظهرت نتائجنا انخفاضاً في معدلات المعلمات التي تقيس الحيوانات المنوية كدالة لوقت التبريد (من 0 إلى 6)، على الرغم من أن تقييم الحيوانات المنوية بالطرق التقليدية تعتبر طرقاً مرجعية، إلا أن الطرق الأحدث، تقدم ربحية أفضل بفضل منشأتها وسرعتها ودقتها باستثناء أن التحكم الأفضل في الاستخدام ضروري للحصول على نتائج موثوقة. لا يزال يتعين إجراء العديد من الدراسات من أجل تحسين فعالية البروتوكولات وطرق تقييم السائل المنوي.

الكلمات المفتاحية: السائل المنوي للكلاب، التبريد، الحيوية، الحركية، الطرق التقليدية، قياس التدفق الخلوي، النظام

.CASA

Introduction

La production de semence commence par la collecte du sperme (Kabera, 2008). Ensuite l'analyse de la semence se pratique conventionnellement sur deux plans macroscopique et microscopique, comprend la numération des spermatozoïdes, l'analyse de la mobilité et de la vitalité et la morphologie. Ces techniques classique demeure entachée d'une grande part de subjectivité et souffre par conséquent d'une grande variabilité des résultats entre les différents manipulateurs ainsi que les différents laboratoires (**Auger et Eustache, 2000**). D'autres part l'avènement de l'analyse spermatique assistée par ordinateur (CASA : Computer Aided Sperm Analysis), est utilisé avec un grand succès étant une technique moderne pour mesurer des paramètres cinétiques et morphométriques.

De plus, différents marqueurs fluorescents ont été développés pour tester les capacités fonctionnelles des spermatozoïdes. L'interprétation des tests basés sur l'utilisation de ces marqueurs nécessite le recours à des techniques telles que la cytométrie en flux (**Cabannes, 2008**).

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**).

L'insémination à semence réfrigérée donne de meilleurs résultats par rapport à la congélation et présente l'avantage dans les procédés de conservation et de transport de la semence. Cependant, la durée de conservation reste très limitée et représente l'inconvénient majeur. Si cette durée s'allonge dans le temps, la réfrigération serait la solution pour pallier aux inconvénients de la congélation. En effet, en 2001, IGUER-OUADA et VERSTEGEN ont été les premiers à démontrer la possibilité avec succès de réfrigérer le sperme de chien pendant une dizaine de jours.

Ce mémoire portera uniquement sur la conservation des gamètes males, les spermatozoïdes chez l'espèce canine. Elle est présentée en deux grands volets, la première porte sur les données bibliographiques relatives à la reproduction chez le chien, collecte, évaluation de la qualité de la semence, puis nous nous intéresseront au principe et aux apports de la cytométrie en flux et le système CASA. Le second volet est représenté par l'étude expérimentale, dans l'optique de trouver des réponses aux questions suivante :

Comment maîtriser les étapes d'évaluation d'une semence ?

Quel est l'effet du froid sur l'intégrité membranaire et la mobilité du spermatozoïde ?

Etant que le système CASA et la cytométrie en flux sont des techniques non conventionnelles automatisées qui mesurent plusieurs paramètres en même temps, est-ce que cela veut dire qu'elles sont aussi plus fiables que les méthodes d'évaluation classiques ?

CHAPITRE I : DONNES BIBLIOGRAPHIQUES

I. Généralité sur la biotechnologie de reproduction

La biotechnologie de la reproduction comprend les différentes techniques utilisées pour la conservation des ressources biologiques. Afin de conserver les ressources biologiques d'une espèce et plus particulièrement d'un individu à haute valeur génétique. Les différentes techniques biotechnologiques de la reproduction sont aujourd'hui accessibles pour les différentes espèces (**Bruyère ,2015**).

D'après Hilebrandt et ses collaborateurs (2018), il est intéressant de noter qu'il existe trois(3) techniques biotechnologiques disponibles à savoir :

(i)- Désigne la collecte de sperme (à l'aide d'un vagin artificiel ou par électro-éjaculation), du sperme épидидymaire ou encore des tissus testiculaires. Les cellules peuvent être conservées pour ensuite être à destination d'insémination artificielle ou de fécondation in vitro (FIV) et ou d'injection intracytoplasmique du spermatozoïde (ICSI).

(ii)- Désigne les méthodes de collecte du tissu de cortex ovarien, des ovocytes et des différentes techniques .Une allogreffe de tissus de cortex ovarien avec de fécondation in vitro (FIV) et ou d'injection intracytoplasmique du spermatozoïde (ICSI).Des transferts embryonnaires (TE) peuvent être effectués à l'aides d'embryon cryoconservés afin d'obtenir un descendant. Par ailleurs, les cellules souches embryonnaires et les embryons peuvent servir au clonage et créée un individu de la même génération.

(iii)-Les tissus somatiques : Tels que les fragments de peau ou de cartilage peuvent permettre la dérivation de cellules somatiques qui donneront des cellules souches pluripotentes induites (PSC) après reprogrammation. Suite à leur conservation ces cellules peuvent servir au clonage pour créer un même individu que celui collecté. Elles peuvent aussi être transformées en cellules germinales (spermatozoïde, ovocyte) pour créer des descendants.

II. Méthodes biotechnologiques pour la conservation de biospécimens en reproduction

Les biotechnologies ont été utilisées pour conserver du matériel cultivé in vitro, par deux méthodes :

II.1. La cryoconservation

L'objectif de la cryoconservation est l'arrêt du métabolisme cellulaire de manière réversible tout en préservant l'intégrité des membranes. L'eau étant présent de manière importante de tout type de cellule, la transition liquide-solide de l'eau dans les biomatériaux est un phénomène qui doit être maîtrisé en cryoconservation (**Karlsson et Toner, 1996**).

II.2. Conservation par réfrigération

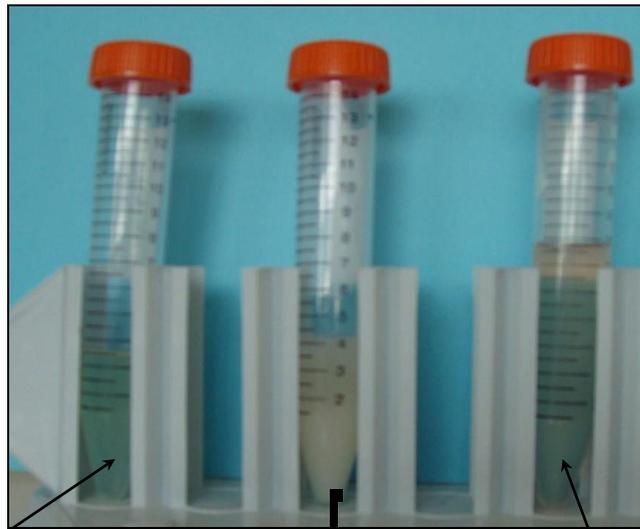
Pour la croissance en vie ralentie, la technique la plus largement utilisée est la réduction de la température qui peut être combinée avec une diminution de l'intensité lumineuse ou avec une culture à l'obscurité à températures de l'ordre de 0-5 °C (**Withers, 1998**).

III. Semence canine et caractéristiques physiques

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**).

III.1. Caractéristiques générales de la semence canine

L'éjaculat du chien est un liquide blanchâtre. Le volume de l'éjaculat dépend de la race et de l'individu ; il varie de un(01) à quatorze millilitres (14 ml) (**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 (**Fig.2, Tab.1**).



Phase pré-spermatique Phase spermatique Phase post-spermatique

Figure.01 : Les trois phases de l'éjaculat du chien (**BRIFFAUT, (2007)**).

Tableau.01 : Description des trois phases de l'éjaculat du chien (**Fontbonne, Dumont,1992**).

	Origine	Aspect	Volume	pH	Composition
Phase pré-spermatique	Prostate.	Blanchâtre	0.2 à 2 ml	6.2 – 6.5	+ Moins de 3 millions de spermatozoïdes + Liquide prostatique
Phase spermatique	Epididyme.	Plus ou moins laiteuse	0.5 à 3.5 ml	6.3 – 6.6	+ Très riche en spermatozoïdes + Sécrétion épидидymaire
Phase post-spermatique	Prostate 75% Epididyme 25%	Clair	4 à 30 ml et plus	6.5 – 7.0	+ Très rare spermatozoïdes + Liquide prostatique

III.2. Composition de la semence canine

III.2.1. 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 (Prins, 1998).

III.2.2. Les spermatozoïdes canins

Le spermatozoïde est le gamète mâle. C'est une cellule haploïde hautement spécialisée, de forme oblongue. Il mesure 62 à 70 μm chez le chien ; la queue mesure à elle seule 65 μm (Fontbonne et Dumont, 1992).

III.2.2.1. Origine et maturité

Les gamètes males fécondants, proviennent d'un processus physiologique, la spermatogénèse qui permet la production des gamètes males matures: les spermatozoïdes. La durée de la spermatogénèse n'est pas clairement établie, elle varie de soixante-trois à soixante-dix jours suivant. La quantité de spermatozoïdes produits est proportionnelle à la taille du chien; elle varie de deux cent millions à plus de deux milliards de spermatozoïdes par éjaculat (Fontbonne et *al.*, 2000).

La spermatogénèse se déroule au sein de la paroi des tubes séminifères en deux étapes successives : la spermatocytogénèse qui permet de passer du stade spermatogonie au stade spermatide et la spermiogénèse qui permet la différenciation des spermatides en spermatozoïdes. Les spermatozoïdes sont finalement libérés dans la lumière des tubes séminifères au cours de la spermiation. 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. Après une abstinence prolongée, la qualité de la semence peut être altérée du fait d'une surmaturation épидидymite (Fontboone, 1992).

III.2.2.2. Subdivisions cellulaires du spermatozoïde

La membrane plasmique : La membrane du spermatozoïde est organisée en domaines spécifiques. Une proportion de lipides membranaires (30 à 50%) semble ancrée dans la membrane. Chaque domaine contient un assortiment de lipides et protéines fonctionnant ensemble et responsable d'une fonction particulière de la membrane. La membrane de la tête du spermatozoïde possède des domaines participant à la reconnaissance cellulaire et à la fusion membranaire, étapes de la fécondation. La pièce intermédiaire dans laquelle se trouvent toutes les mitochondries de la cellule a, quant à elle, des domaines responsables de l'acheminement des molécules nécessaires à la production d'ATP et à la régulation de mouvements des microtubules de l'axonème (Dean et Lodhi, 2018).

La tête du spermatozoïde : La tête du spermatozoïde contient le noyau et l'acrosome, ainsi qu'une quantité faible de cytoplasme et des éléments du cytosquelette. Elle est de forme ovoïde et aplatie dorso-ventralement chez le chien, et mesure 4 à 5 micromètres de longueur. L'acrosome suit les contours du noyau sur toute la partie crâniale (Dean et Lodhi, 2018) (Fig. 03).

- 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).

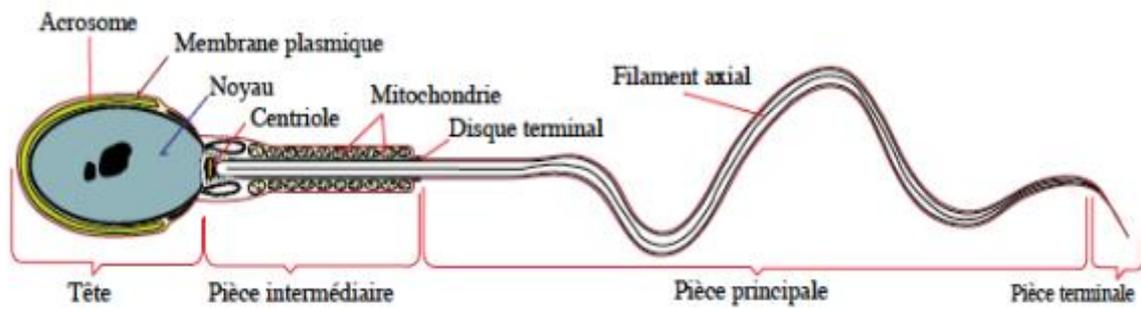
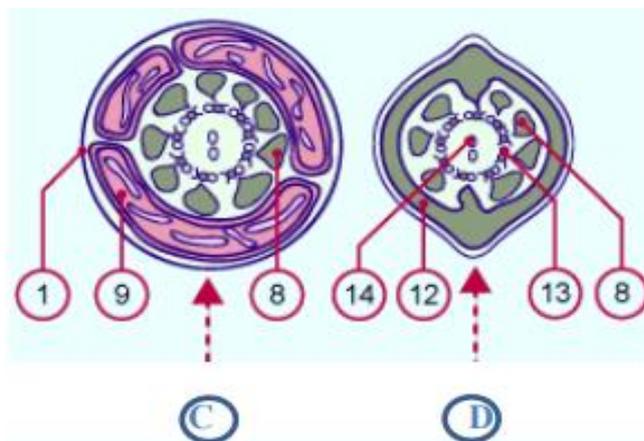


Figure.02 : Structure schématique du spermatozoïde (Mariana,2006).

Le flagelle : Le mouvement des spermatozoïdes canins, comme de tous ceux des mammifères, dépend de leur flagelle. Celui-ci est composé de plusieurs parties essentielles : l'axonème, la gaine fibreuse et les fibres denses. L'énergie nécessaire à son mouvement est fournie par les mitochondries présentes dans la pièce intermédiaire (Fig.04) (Knobil et Neill, 1998). Chez le chien, Le flagelle mesure 55 micromètres et est divisible en quatre sections : la pièce connective, la pièce intermédiaire, la pièce principale et la pièce terminale (Fig.03).

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).



1: Membrane plasmique.

8 : Faisceaux longitudinaux extérieurs.

9 : Mitochondrie.

12: Gaine fibreuse.

13: Tubules doubles périphériques : doublet de microtubule A et B.

14: Tubules simples centraux.

C : pièce intermédiaire.

D : pièce principale.

Figure.03 : la pièce intermédiaire et principale du spermatozoïdes (Fribourg et al.,2005).

IV. Méthode de collecte de la semence canine

IV.1. Récolte de la semence canine

La récolte du sperme est un procédé par lequel on obtient le sperme sur l'animal vivant. La récolte ne se fait que sur des animaux sains, reconnus indemnes vis-à-vis de certaines infections (Parez et Duplan, 1987).

Plusieurs techniques sont utilisables pour effectuer la récolte du sperme : la technique manuelle, l'électroéjaculation et la technique employant des vagins artificiels. L'électroéjaculation a été peu étudiée chez le chien. La méthode la plus utilisée actuellement pour le prélèvement de semence chez le chien est la récolte manuelle par massage des parties génitales éjaculatrices. Cette méthode simple a été utilisée dès 1780 par l'abbé Spallanzani (Fontbonne, 1992).

Dans cette méthode le matériel utilisé est des cônes en caoutchouc raccordés à des tubes de centrifugation stériles en plastique.

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 (Fig.04). L'idéal est de laisser les cônes dans une étuve afin qu'ils soient tièdes au moment du prélèvement (Fontbonne, 1992).

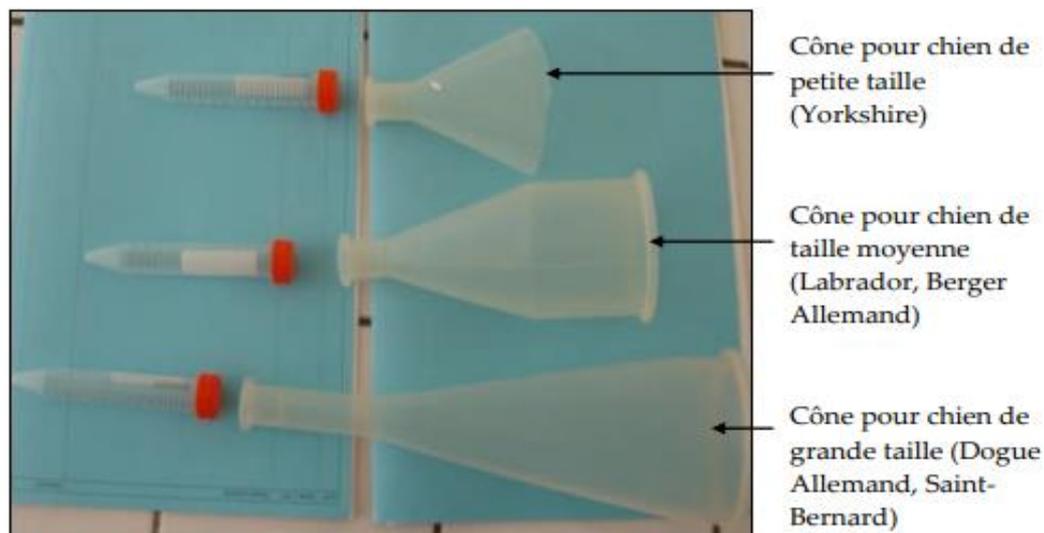


Figure.04: Matériel nécessaire à la récolte du sperme chez le chien (Fontbonne, 1992).

➤ 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, 1992**).

➤ **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**).

➤ **Stimulation digital**

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**).

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. (**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. 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. A ce stade, l'érection est totale et l'éjaculation des deux premières phases a lieu ; elle dure entre deux et cinq minutes. 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.

V. Evaluation de la qualité de la semence

L'évaluation de la qualité du sperme a pour objectif d'apprécier ses caractéristiques afin de définir le niveau possible de sa dilution. Elle permet ainsi de préparer une semence correspondant à l'optimum biologique et économique recherché. Elle comporte des examens macroscopiques, microscopiques, physico-chimiques et biochimiques (**Fontbonne et Dumont, 1992**).

V.1. Les méthodes conventionnelles

V.1.1.Examens macroscopiques

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

V.1.1.1.Volume de l'éjaculat : le volume de l'éjaculat est lu sur le tube de collecte gradué. Ce volume varie de 0,5 à 14 ml, en fonction de l'âge, la race, l'alimentation, l'état de santé, les conditions de récolte ainsi que de la fréquence de récolte.

V.1.1.2.Couleur du sperme : il est de couleur blanchâtre L'aspect est généralement homogène et crémeux. Le sperme pathologique peut avoir, selon les cas, une couleur brunâtre, rosée, bleuâtre, jaunâtre, rougeâtre ou grisâtre.

V.1.1.3.Viscosité du sperme : elle traduit la consistance du sperme et en même temps sa concentration en spermatozoïdes. Une bonne viscosité est probablement synonyme d'une bonne concentration en spermatozoïdes (**Fontbonne, 1995**).

V.1.2. Examens microscopique

C'est l'évaluation de la motilité, de la concentration en spermatozoïdes, du pourcentage en spermatozoïdes vivants et de la morphologie des spermatozoïdes.

V.1.2.1. La Motilité

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

V.1.2.1.1. Motilité massale

Elle s'apprécie au microscope au grossissement x10. A l'examen microscopique d'une goutte de sperme non diluée, l'observateur s'intéresse aux mouvements et à l'effet du déplacement des spermatozoïdes dans le liquide séminal. A l'issue de l'observation, en fonction du mouvement de masse des spermatozoïdes. L'exigence minimale pour un éjaculat correspond. Un bon mouvement de masse qui doit être tourbillonnant (environ 60% de spermatozoïdes mobiles) (**Tab.02**) (**Rukundo, 2009**).

Tableau.02: Notes attribuées aux éjaculats selon leur motilité massale (**Rukundo, 2009**).

Note	Observation
0	Immobilité.
1	Leger mouvement, absence de vagues.
2	Vagues peu nombreuses.
3	Vagues nombreuses.
4	Vagues rapide et intense.
5	Tourbillons très rapides.

V.1.2.1.2. Motilité individuelle

Elle s'apprécie au microscope au grossissement x40. C'est l'appréciation du mouvement des spermatozoïdes par leur déplacement à travers le champ microscopique. Les mouvements normaux des spermatozoïdes sont oscillatoires et progressifs. Ce test se réalise sur du sperme dilué à 1/10 de sérum physiologique. Un bon sperme doit avoir au moins 60 à 70 % de spermatozoïdes vivants (**Tab.03**)

Tableau.03 : Notes attribuées aux éjaculats suivant leur motilité individuelle, dans une grille de notation de 0 à 5 (**Rukund, 2009**).

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

V.1.2.2. La Numérotation

La numération se fait par comptage des spermatozoïdes entre une lame et lamelle d'une cellule hématimétrique (Thoma, Malassez, Neubauer.), après une dilution (au 1/100ème ou

1200 ème) dans une solution hypertonique (NaCl à 3 %) pour immobiliser les spermatozoïdes. La concentration est calculée selon une équation spécifique à chaque hématimètre.

V.1.2.2.1. L'hémocytomètre avec une règle de Neubauer améliorée

L'utilisation de chambres d'hémocytomètre avec une règle Neubauer améliorée est recommandée. L'hémocytomètre Neubauer amélioré possède deux chambres de comptage séparées, chacune d'elles possède un motif microscopique de 3 mm × 3 mm de lignes de grille gravées sur la surface de verre. Il est utilisé avec une lamelle épaisse spéciale (épaisseur n° 4, 0,44 mm), qui repose sur les grilles et est soutenue par un support. Qui repose sur les grilles et est soutenue par des piliers de verre situés à 0,1 mm (100 µm) au-dessus du plancher de la chambre. Chaque zone de comptage est divisée en neuf grilles de 1 mm × 1 mm. Ces grilles sont désignées par les numéros indiqués à la figure 05.

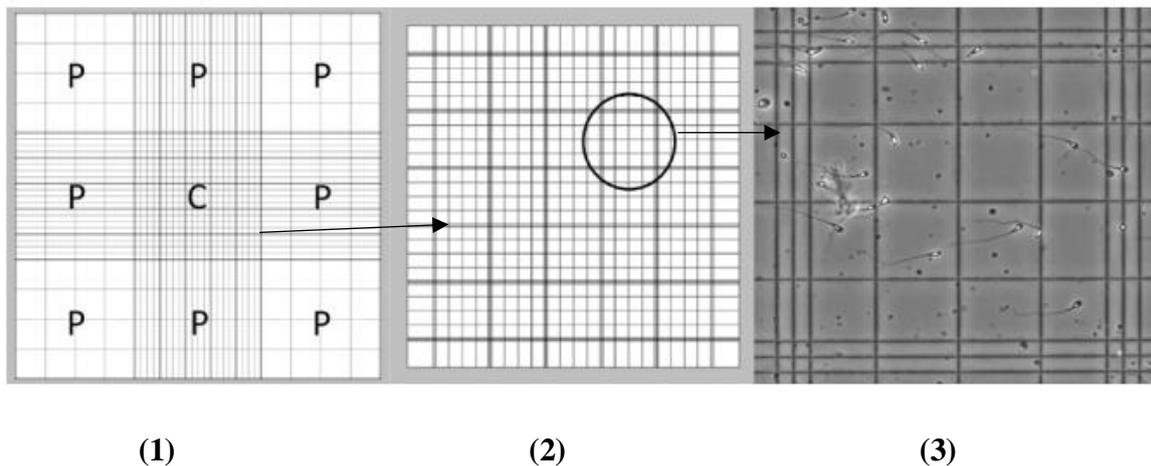


Figure.05: Chambre de l'hémocytomètre pour la numération des spermatozoïdes.

La zone(1) inscrite montre : les neuf grilles dans une chambre de l'hémocytomètre (gauche), la grille centrale (C) et les huit grilles périphériques (P). La grille centrale est constituée de 25 grands carrés (panneau central 2) ; et une micrographie d'une partie de la chambre remplie (panneau de droite 3), montrant l'un des 25 carrés de la grille centrale (le carré encerclé dans le panneau du milieu 2), délimité par des lignes triples et contenant 16 carrés plus petits. Les huit grilles périphériques ont la même taille que la grille centrale, mais la taille et le nombre des petits rectangles varient.

- En fonction de la dilution et du nombre de spermatozoïdes comptés, différentes zones de la chambre sont utilisées pour déterminer les spermatozoïdes. En général, la grille centrale est

utilisée pour le comptage. Les huit grilles périphériques sont utilisées lorsque moins de 200 spermatozoïdes ont été comptés dans la grille centrale (**Kirkman et Bjorndlh, 2009**).

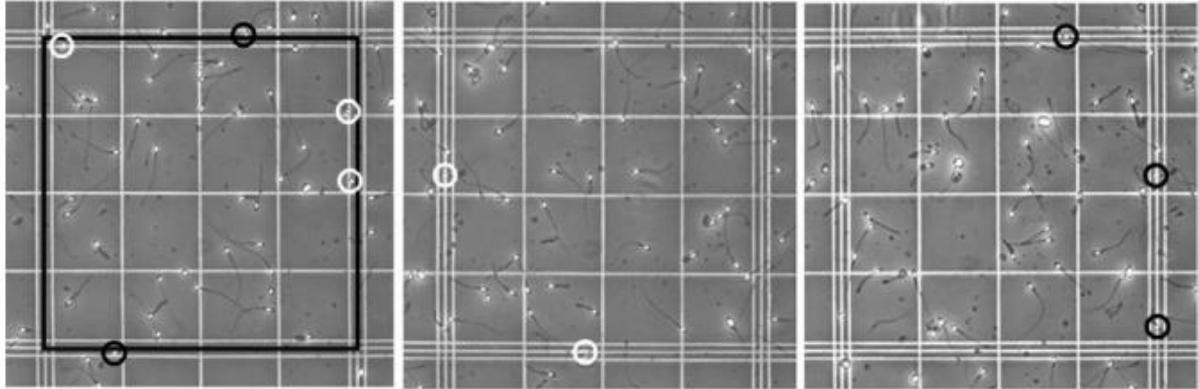


Figure.06 : Les spermatozoïdes comptés dans les carrés de la grille.

La ligne centrale des trois lignes définit la limite du carré (ligne noire, panneau de gauche). Tous les spermatozoïdes dans le carré central sont comptés (cercles blancs). Un spermatozoïde dont la tête se trouve sur la ligne centrale n'est compté que si cette ligne est la limite inférieure ou gauche du carré (cercles blancs, panneau central), mais pas s'il s'agit de la ligne supérieure ou droite du carré (cercles noirs, panneau droit) (**Kirkman et Bjorndlh, 2009**).

V.1.2.2.2. Numérotation par spectrophotomètre

C'est une technique automatisé pour évaluer la concentration de la semence par un photomètre compact et très précis, développé pour mesurer les concentrations de spermatozoïdes. Il peut être calibré pour les espèces bovines, canine, équine, porcins et les petits ruminants. Le nettoyage est simple, la maintenance est minimale, La concentration de sperme est affichée en millions de spermatozoïdes/ml.

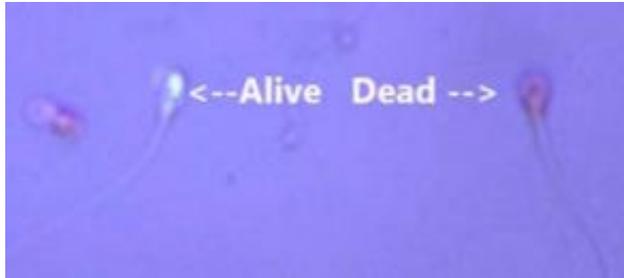
V.1.2.3. La vitalité

La vitalité est le pourcentage de spermatozoïdes vivants. Ce paramètre donne une bonne indication de la qualité de la semence.

V.1.2.3.1. Test de vitalité utilisant l'éosine-nigrosine

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**).



Dead : Spz mort.

Alive : Spz vivant.

Figure.07 : Exemple de coloration obtenue au microscope avec la coloration éosine-nigrosine d'après le laboratoire (**Fertipron, 2016**).

V.1.2.3.2. Test de vitalité par gonflement hypo-osmotique

Comme alternative à l'exclusion des colorants, le test de gonflement hypo-osmotique peut être utilisé pour évaluer la vitalité (**Jeyendran et al. 1984**). Cette méthode est utile lorsque la coloration des spermatozoïdes doit être évitée, par exemple, lors du choix des spermatozoïdes pour l'injection intra cytoplasmique de spermatozoïdes (ICSI). Le test de gonflement hypo-osmotique part du principe que seules les cellules dont la membrane est intacte (cellules vivantes) peuvent gonfler dans un milieu hypotonique. Les spermatozoïdes à membrane intacte gonflent en 5 minutes dans un milieu hypo-osmotique, et toutes les formes flagellaires sont stabilisées en 30 minutes (**Hossain et al., 1998**).

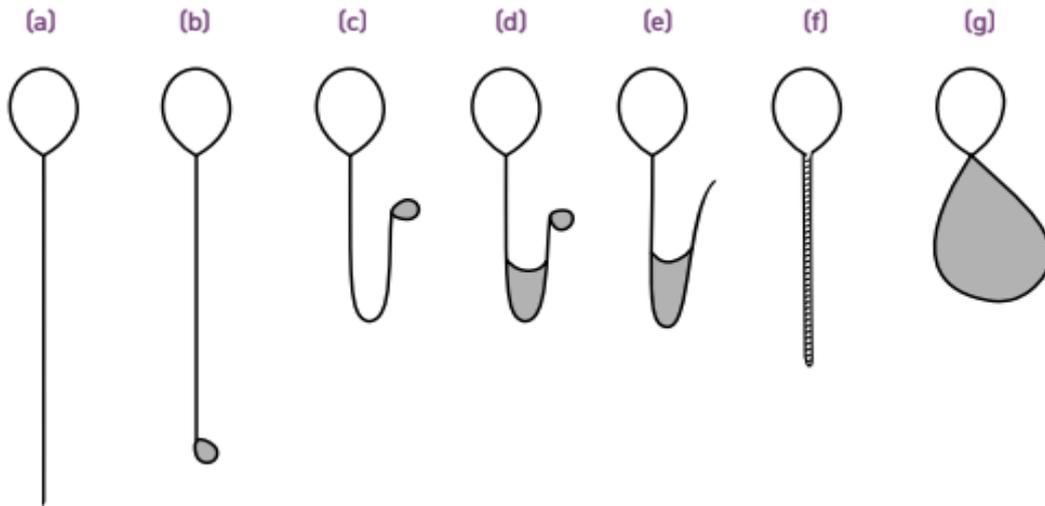
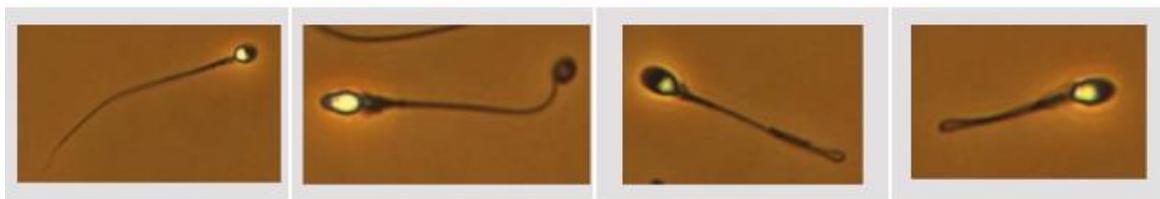


Figure.08 : Représentation schématique des changements morphologiques typiques des spermatozoïdes humains soumis à un stress hypo-osmotique. (WHO, 2021)



1. Queue normale / 2. Extrémité de la queue enroulée / 3. <50% de la queue repliée / 4. 50% de la queue repliée.

Figure.09 : Photomicroscopies sous microscope à contraste de phase de spermatozoïdes soumis à un stress hypo-osmotique. (Holmes, 2020)

V.1.2.4. Le spermocytogramme

Lors du spermocytogramme, on évalue la quantité de spermatozoïdes possédant une morphologie anormale. Plusieurs classifications des anomalies morphologiques existent. L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) les a classés en fonction de leurs localisations, elles sont résumées dans le tableau 04 (Johnston et al., 2001).

Tableau.04 : Classification des anomalies morphologiques de la semence selon l'OMS
(2021).

A : Anomalie de la tête	B : Anomalie de la pièce intermédiaire	C : anomalies du flagella	D : Anomalie de l'acrosome
- Double Tête. - Macrocéphalie. - Microcéphalie. - Tête pyriforme. - Décapitée. - Aplatie. - En flammèche. - Séparée du flagelle.	- Gouttelette cytoplasmique résiduelle proximale ou distale. -Double pièce intermédiaire. -Courbée. - Epaissie. - Implantation abaxiale.	- Enroulement proximal. - Enroulement distal. - Double flagelle. - Courbée. - Coudée. - Epaissi et enroulé avec la pièce intermédiaire.	- Noduleux. - Détaché.

Ces anomalies peuvent être également classées en fonction de leur origine :

- ❖ Anomalie primaire : due à une spermatogénèse défectueuse.
- ❖ Anomalie secondaire : acquise lors du transit épидидymaire ou urétral.

Enfin une classification en fonction de leur impact sur la capacité de fécondation est réalisable :

- ❖ Anomalie majeure pour la fécondation : par exemple une tête piriforme, gouttelette proximale, queue enroulée.
- ❖ Anomalie mineure pour la fécondation : par exemple une tête repliée, une gouttelette distale, queue repliée (**Dumon, 2008**).

Les anomalies morphologiques seront visualisables au microscope optique et sont résumées dans les figures ci-dessous :

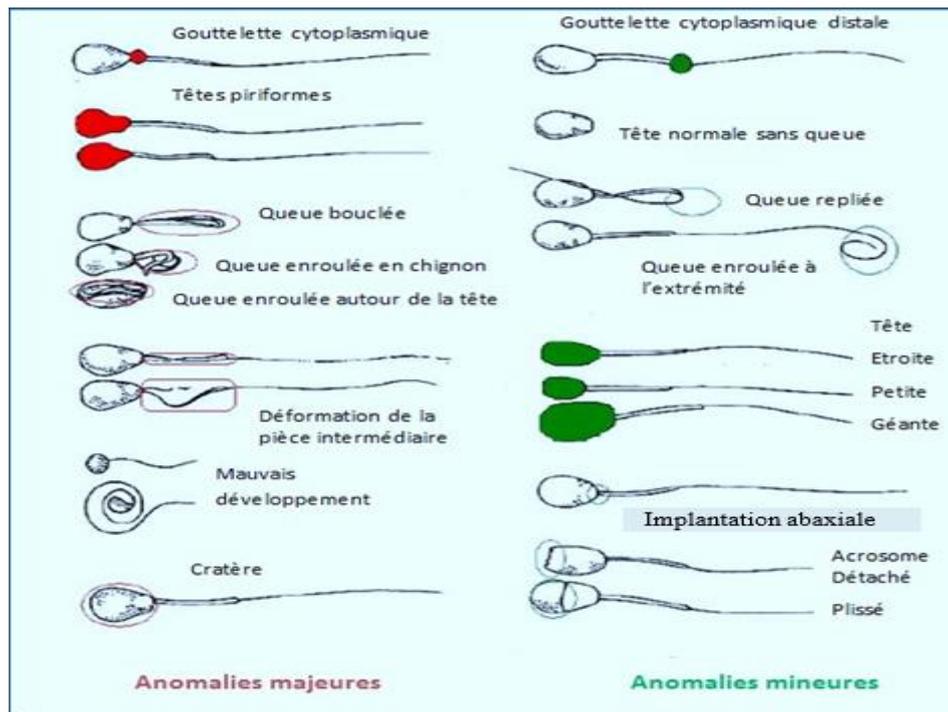


Figure.10: Schéma des principales anomalies majeures et mineures (OTT *et al.*, 1987)

V.2. Les méthodes non conventionnelles

V.2.1. La cryométrie en flux

La cytométrie mesure les propriétés optiques d'une cellule, transportée par un liquide vecteur caractérisé par le flux, jusqu'à une source d'excitation lumineuse étant la plupart du temps un laser (Diaz, 2014).

En d'autres termes, la cytométrie en flux est une technique effectuant une analyse multiparamétrique, de cellules individualisées, s'effectuant à la vitesse de milliers d'évènements à la seconde. L'ordinateur associé calcule des statistiques sur la distribution des paramètres mesurés et les représentent sous forme d'histogramme ou cryptogramme. Enfin, l'ultime fonction du cytomètre est de séparer les sous-populations cellulaires en fonction de leurs propriétés optiques et permettre ainsi un tri cellulaire (Cambournac, 2012).

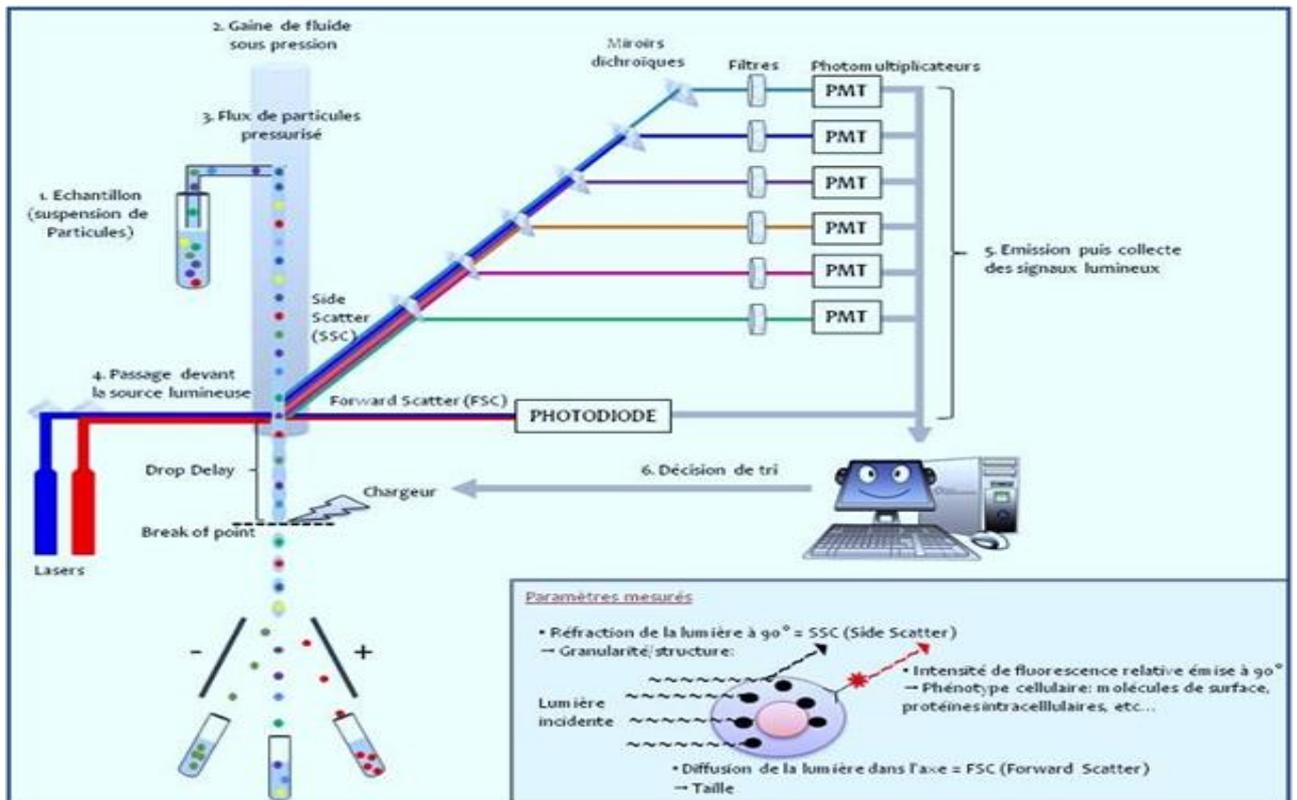


Figure.11 : Schéma démontrant le principe de la cytométrie en flux (Tourrel-Cuzin, 2012).

- **Système fluide** : focalisation hydrodynamique de l'échantillon
- **Système lumineux** : source lumineuse réalisant une excitation cellulaire
- **Système optique** : capture des signaux lumineux émis par les cellules
- **Système de conversion** : conversion des signaux lumineux en signaux électriques
- **Système informatique** : analyse et représentation graphique des mesures.
- **Système de tri** : tri cellulaire de la sous-population cible

Figure.12 : Les différents systèmes intervenants dans le cytomètre en flux. (Ronot et al., 2006).

V.2.1.1. Système optique : capture des signaux lumineux

Le système optique intervient lors du passage des cellules au niveau de la source lumineuse. Ces dernières émettent en réponse à cette excitation différents signaux lumineux qui

sont collectés et dirigés vers les photo-détecteurs à l'aide d'un banc optique. Les signaux lumineux détectés sont de différentes natures (**Gilman-sache, 1994 ; Shapiro, 2005**)

- FSC (Forward Scatter) : lumière diffractée aux petits angles, elle renseigne sur la taille des particules et sur la surface cellulaire.
- SSC (Side Scatter) : la lumière réfléchiée et réfractée aux grands angles, elle renseigne sur la granularité et la complexité cellulaire.

La fluorescence émise à 90°C dépend du phénotype cellulaire :

- Fluorescence émise par la cellule elle-même : auto fluorescence.
- Fluorescence émise par un anticorps couplé à un fluorochrome avec liaison spécifique à la cellule.

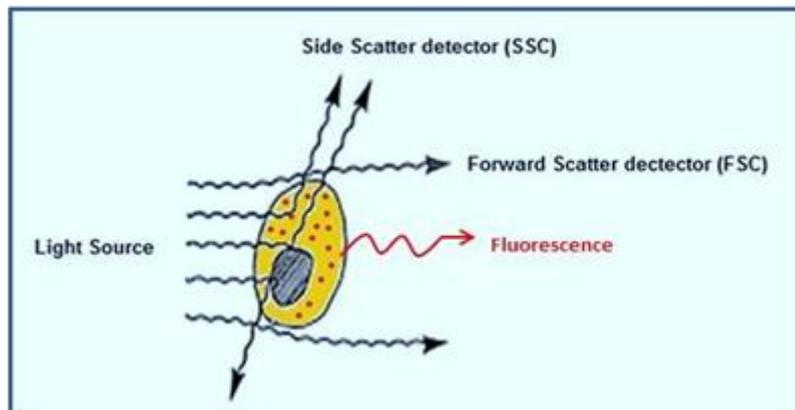


Figure.13 : Interaction de la lumière avec la cellule (**University of Aberdeen, 2010**)

V.2.1.2. Application de la cytométrie en flux dans l'analyse du spermatozoïde canin

De nombreuses sondes fluorescentes ont été appliquées à l'évaluation des caractéristiques spécifiques du sperme chez les chiens. La cytométrie en flux permet l'observation caractéristique des cellules telles que la taille, la forme et la fonction du spermatozoïde, qui peut être révélé par un fluorochrome.

L'analyse des événements détectés sur les dots plots donne des informations précises et hautement fiables sur l'intégrité de la membrane, statut acrosomique, activité mitochondriale, état de capacitation, peroxydation lipidique, apoptose et dommages à l'ADN.

- **Intégrité de la membrane** : L'intégrité de la membrane des spermatozoïdes de chien peut être évaluée à l'aide de combinaisons de différentes fluorescentes sondes comprenant SYBR-

14avec iodure de présidium(PI) (**Rijsselaere et al., 2002;Cheuquama et al.,2012**). La viabilité membranaire des spermatozoïdes intacts présentent une fluorescence verte tandis que les cellules mortes deviennent fluorescentes en rouge. La détection d'une troisième sous-population (c'est-à-dire les spermatozoïdes moribonds) est un autre avantage (**Rijsselaere et al., 2005**). Cette population se compose de spermatozoïdes présentant à la fois rouge et verte fluorescence représentant un sperme légèrement endommagé a perdu sa capacité à exclure iodure de présidium (PI) (**Garner et Johnson, 1995**).

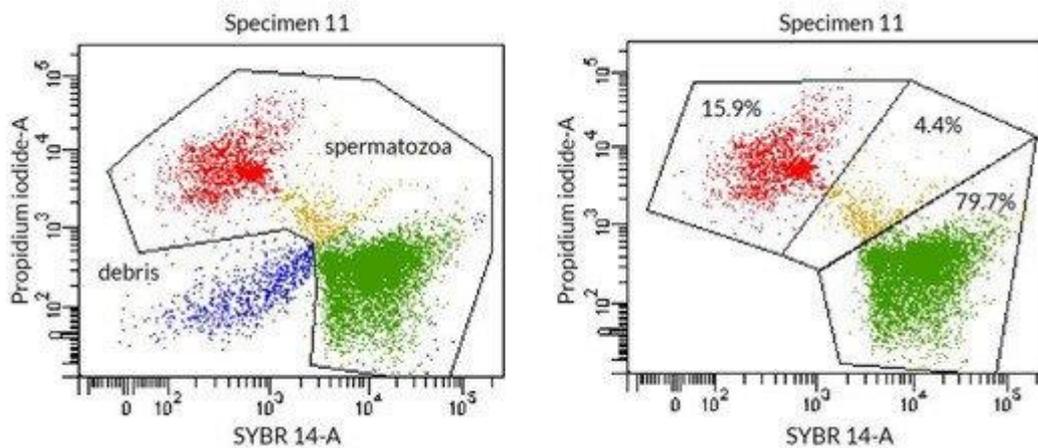


Figure.14 : Exemples de graphiques au cymomètre en flux concernant l'intégrité des spermatozoïdes. Coloration SYBR 14 et iodure de présidium (PI). Spermatozoïdes rouges morts dont l'intégrité de la membrane cellulaire est altérée ; spermatozoïdes jaunes-doubles positifs commençant à perdre l'intégrité de la membrane cellulaire ; spermatozoïdes verts-viables dont l'intégrité cellulaire est intacte ; débris ou fragments de spermatozoïdes brisés bleus. (**Yan et al., 2019**) .

V.2.2. L'analyse informatique de la semence (CASA)

Inventé par Dott et Foster, 1979 l'analyse par le CASA (Computer Aid Sperm Analysis) permet d'évaluer rapidement un grand nombre de spermatozoïdes avec des mesures objectives et quantitatives. (**Gravance et al., 1998; Rijsselaere et al., 2005**). Elle a été utilisée dans un premier temps en médecine humaine, puis elle a été étendue aux animaux de production et enfin aux carnivores domestiques au début des années 2000.

Le système CASA est composé d'un hardware et d'un software qui sert à visualiser et numériser une séquence d'images de sperme. Il permet l'obtention de résultats clairs, précis,

qui nous informent sur différentes qualités de paramètres spermatiques, notamment la concentration, la motilité, la morphologie, et la morphométrie (Talarczyk-Desol et al., 2017)

La première étape de ce processus consiste à identifier toutes les têtes de spermatozoïdes et à les enregistrer. Cependant la fréquence de capture (FC) est définie comme étant le nombre d'images acquises par seconde lors de l'obtention de la trajectoire du sperme dans le CASA.

Pour l'analyse du mouvement des spermatozoïdes, les images représentent généralement une exposition de 0,02 seconde à une fréquence de 50 images par seconde. L'exposition de l'image peut être contrôlée via un obturateur de caméra ou la durée d'impulsion de l'éclairage stroboscopique (Lu et al., 2014)



Figure.15 : Analyseur Spermatique assistée par ordinateur, CASA, Hamillton Thorn IVOS II (Talarczyk-Desol et al., 2017)

Des échantillons d'environ 4 μL de sperme dilué avec de l'Easy buffer à 25×10^6 spz/mL, sont déposés dans des cellules de Leja puis disposés sur la plaque chauffante à 37°C . L'analyse des images successives réalisées par l'analyseur va fournir des données (Astorgis, 2015).

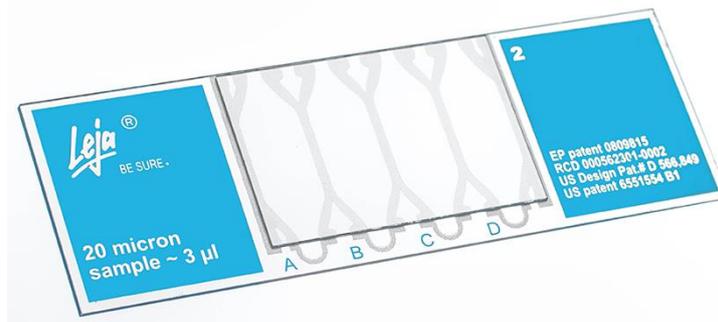


Figure.16 : Image de la lame Leja utilisée pour une analyse par le système CASA.

V.2.2.1. Les données fournies avec la technique CASA

L'analyseur réalise des mesures fiables et reproductibles des paramètres suivants :

- ❖ Le nombre de cellules comptées
- ❖ La concentration
- ❖ Les vitesses de déplacement ($\mu\text{m/s}$) :
 - VAP (Velocity Average Pathway)= vitesse le long de la trajectoire moyenne ($\mu\text{m/s}$)
 - VSL (Velocity Straight Line)= vitesse le long de la trajectoire en ligne droite ($\mu\text{m/s}$)
 - VCL (Velocity Curvilinear Line) = vitesse le long de la trajectoire curviligne ($\mu\text{m/s}$).
- ❖ La mobilité individuelle et le pourcentage de mobilité:
 - Statics. /Progressive./Motile./Lente.
- ❖ La vivacité:
 - ALH : amplitude des mouvements latéraux de la tête, $\mu\text{m/s}$.
 - BCF : fréquence de battement de la tête, Hz.
- ❖ Le comportement du spermatozoïde :
 - Sa rectitude STR : $(\text{VSL}/\text{VAP}) * 100$ exprimée en pourcentage %.
 - Sa linéarité LIN : $(\text{VSL}/\text{VCL}) * 100$ exprimée en pourcentage %.
 - Wobble WOB : $(\text{VAP}/\text{VCL}) * 100$ exprimée en pourcentage %.
- ❖ Morphologies des spermatozoïdes suivantes:

- Pourcentage des spz normaux.
- Bent Tail : Flagelle angulé.
- Coiled Tail : Flagelle enroulé.
- DMR : flagelle replié.
- Gouttelette distale.
- Gouttelette proximale.

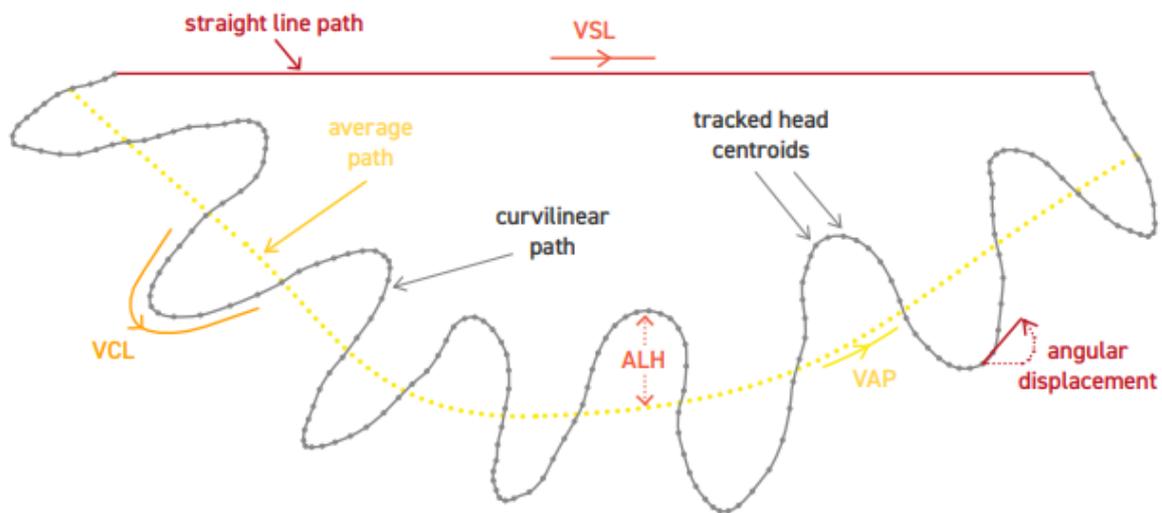


Figure.17 : Terminologie standard pour les variables mesurées par les systèmes CASA.
(Mortimer et Mortimer ,2021).

VI. Facteurs intrinsèques et extrinsèques influençant la qualité de semence

VI.1.Facteurs liés à l'animal

La qualité de la semence canine est influencée par l'état général du chien, par son alimentation et par son poids qui a une incidence directe sur le nombre de spermatozoïdes et sur le volume spermatique. . L'âge du chien a également une influence, en effet, la qualité de la semence peut diminuer dès quatre ou cinq ans chez certaines races. (Fontbonne et Dumont, 1992).

La qualité de la semence est également liée à la fréquence des éjaculations. Deux à trois éjaculations par semaines n'altèrent pas la qualité de la semence. A l'inverse, une abstinence prolongée va diminuer la qualité de celle-ci. (Feldman et Nelson, 1987 ; Fontbonne et al., 2000).

Le volume de l'éjaculat est proportionnel à la taille de la prostate. Cependant, les chiens souffrant d'une hypertrophie bénigne de la prostate ont un volume spermatique moins important en comparaison avec des chiens sains ayant une prostate de taille équivalente. **(Feldman et Nelson, 1987)**

Certains auteurs mettent en évidence une influence saisonnière sur le nombre total de spermatozoïdes, la concentration en spermatozoïdes et sur le nombre de formes anormales. Il y a une augmentation des formes anormales pendant l'été **(Johnston et al., 2001a)**.

VI.2. Facteurs liés au prélèvement

Concernant le prélèvement, plusieurs facteurs sont à considérer : le lieu, la méthode, la stimulation et les compétences de l'opérateur. Tout d'abord, le prélèvement doit avoir lieu dans un endroit calme, avec peu de passage et peu de personnes. Ce lieu doit être connu, et l'habitation de l'animal au lieu facilitera le prélèvement. **(Freshman, 2002)**.

VI.3. Facteurs liés à la conservation

Concernant la semence stockée, on pourra distinguer la semence congelée de la semence réfrigérée. Ainsi, la méthode de cryopréservation pourrait aussi avoir un impact sur la qualité de la semence après décongélation. En effet, d'après Strom, le protocole de congélation entraînerait des modifications de la mobilité des spermatozoïdes **(Strom, et al., 1997)**. De plus, le stockage devra être réalisé dans des conditions optimales. La procédure de décongélation pourrait avoir un impact. En effet, une décongélation trop douce, ou trop prolongée pourra réduire de manière significative le taux de spermatozoïdes vivants ou mobiles. **(Strom et al., 1997)**.

Concernant la semence réfrigérée, l'application des bonnes pratiques de laboratoires et le respect des règles de bases telles que la conservation thermostatée à 4°C, ou encore l'ajout d'un dilueur spécifique permettront de garder la semence le plus longtemps possible sans modifications des propriétés fécondantes **(Verstegen et al., 2005)**.

VII. La réfrigération de la semence canine

Elle consiste à diminuer la température de la semence diluée à 4°C afin de la conserver à cette température pendant une période courte et précise.

VII.1. L'intérêt de l'utilisation de la semence congelée

L'utilisation de la réfrigération de la semence est en expansion dans le domaine de la reproduction canine car elle permet de faire des inséminations à distance lorsque les animaux sont éloignés géographiquement, lorsque la semence est de qualité médiocre ou encore lorsqu'il faut différer une insémination initialement prévue avec de la semence fraîche. Elle permet aussi de conserver et transporter la semence à court ou moyen terme avec des avantages identiques à celle de la congélation tout en évitant les conséquences négatives de transport d'animaux tel que le stress. Les protocoles de réfrigération utilisés sont plus simples et moins chers et moins dangereux que la congélation. **(Linde-Forsberg, 1995)**

VII.2. Condition d'utilisation de la semence : Dilution caractéristiques du dilueur

Le dilueur est utilisé pour augmenter la durée de vie des spermatozoïdes et préserver leur capacité de fécondation **(Linde-Forsberg, 1995)**.

Le dilueur utilisé pour la réfrigération de la semence, doit posséder certaines propriétés à savoir:**(Verstegen et al., 2005)**

- L'isotonicité par rapport à la semence, pour lutter contre le choc osmotique.
- Le pouvoir tampon, pour maintenir un pH proche de la neutralité.
- Le pouvoir de protection et de stabilisation membranaire,
- Le pouvoir nutritif pour fournir l'énergie au métabolisme des spermatozoïdes.
- Le pouvoir anti-oxydant, pour lutter contre l'action néfaste des radicaux libres.

CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES

I. Lieu et durée de la réalisation de la partie expérimentale

Notre étude a été réalisée au niveau de la Plateforme biotechnologique en reproduction des carnivores située à l'université de Saad Dahlab Blida 1. La durée de l'étude est de 35 jours.

II. Modèle biologique

La récolte des semences a été réalisée sur trois (03) chiens de race BPM (Bergers Belges Malinois) : Fidel 3ans, Chopper 6ans et Fax 9ans (**Fig.19**).Appartenance à la Plateforme Biotechnologique en Reproduction des Carnivores (PBRC).L'ensemble des expériences, ont été réalisées avec prélèvement de cinq (05) éjaculats récoltés à 48h d'intervalle minimale, par stimulation manuelle en mois de juin. Tous les animaux étaient en bonne santé.

			
Nom	Chopper	Fidel	Fax
Age	6 ans	3 ans	9 ans
Numéro d'éjaculat	Ejaculat 1 et 3	Ejaculat 2 et 4	Ejaculat 5

Figure.18: Identification des chiens utilisés dans l'étude (originale)

III. Récole de la semence

Pour notre expérience, nous avons récolté la semence de chaque animal manuellement sans présence de femelle en chaleur et avec séparation rigoureuse des trois fractions de l'éjaculat dont seule la fraction spermatique a été utilisée.

Avant utilisation, les tubes et les cônes ont été réchauffés dans une étuve maintenue à une température de 37°C.



Figure.19 : Réchauffement des tubes et des cônes en silicone dans l'étuve universelle à convection naturelle UN110 – Memmert, Allemagne (originale)



Etape1: Début de la récolte, massage en arrière des bulbes.

Etape2: Retrait du fourreau et application en arrière des bulbes.

Etape3: Ejaculation de fraction spermatique.

Etape4: Les trois phases de l'éjaculat dans le bain-marie à 37°C.

Figure.20 : Etapes de la récolte de la semence (originale)

IV. Intervalles d'évaluation de la semence

Cinq (05) Ejaculats ont été analysés par les différentes méthodes ci-dessous 4 fois :

T0 : 0 h, Juste après la récolte (Evaluation de la semence à l'état frais avant de la réfrigérer).

T1 : 48 h après la réfrigération (Evaluation de la semence après 2 jours de réfrigération).

T2 : 96 h après la réfrigération (Evaluation de la semence après 4 jours de réfrigération).

T3 : 144 h après la réfrigération (Evaluation de la semence après 6 jours de réfrigération).

V. Méthodes conventionnelles (Spermogramme)

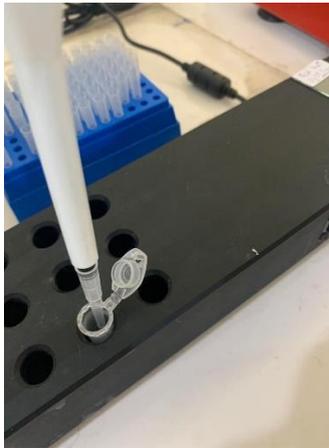
V.1. Le Volume

Le volume de l'éjaculat est très variable en fonction des individus. La lecture se fait à l'aide d'un tube gradué sans tenir compte de la partie mousseuse de l'éjaculat.

V.2. La mobilité

V.2.1. Mobilité massale

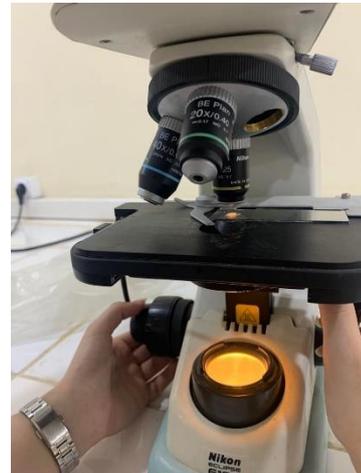
Une goutte de sperme frais est déposée sur une lame pré-chauffée et observée immédiatement au microscope à platine chauffée (+37°C) avec un faible grossissement(100). Les mouvements par vagues, de réunion et de dispersion des spermatozoïdes sont appréciés et une note de 0 à 5 est alors attribuée selon l'échelle de MILOVANOV.



Etape1 : Prendre une goutte de sperme frais à l'aide d'une micropipette.



Etape2 : Déposée sur une lame pré-chauffée

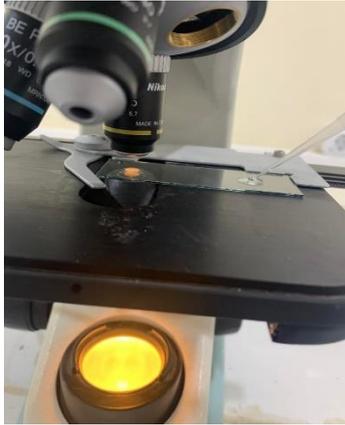


Etape3 : Observation immédiate au microscope à platine chauffée (+37°C) avec un grossissement (x100). Sous un microscope Nikon E100-LED. (P.F Japon).

Figure.21 : Evaluation de la mobilité massale (originale)

V.2.2. Mobilité individuelle

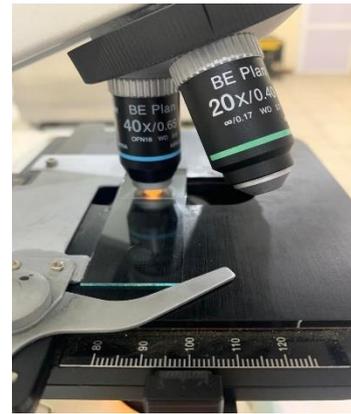
Une goutte de sperme dilué avec de l'Easy buffer (Dilueur commercialisé par IMV Technologies, France), est déposée entre lame et lamelle et observée au grossissement (400). Le pourcentage des spermatozoïdes fléchants est apprécié subjectivement et une note est donnée entre 0 et 5 (0% - 100%).



Etape1 : On met une goutte de sperme dilué avec de l'Easy buffer sure la platine chauffante du microscope Nikon E100.



Etape2 : On la dépose entre lame et lamelle.



Etape3 : On observe au grossissement (400). Le pourcentage des spermatozoïdes fléchants.

Figure.22 : Evaluation de la mobilité individuelle (originale)

V.3. Mesure de la concentration des spermatozoïdes par le photomètre

La concentration des spermatozoïdes a été évaluée au moyen d'un photomètre étalonné pour le sperme canin (SDM Canine, Minitub, Allemagne). Après calibrage de l'appareil, la cellule de lecture est remplie d'une goutte de sperme pur puis chargée dans l'appareil. Le résultat est rendu en quelques secondes.



Etape1: Calibrage du photomètre SDM 1.



Etape2: Remplissage de la cellule de lecture par une goutte de sperme pur à l'aide d'une micropipette de 40µl.



Etape3: Chargement de la cellule de lecture dans le SDM1.



Etape4: Le résultat qui apparaîtra après 3s en millions de spz/ml.

Figure.23 : Lecture de la concentration des spermatozoïdes sur photomètre (originale)

V.3.1. L'hémocytomètre avec une règle de Neubauer a été utilisé

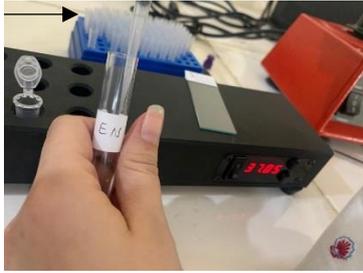
La propreté de la cellule est vérifiée sous le microscope .Par la suite

- Une lamelle sur les plates-formes latérales élevées de l'hématimètre est déposée où un volume précis et connu de liquide biologique va permettre de compter les cellules. De l'eau distillée est humecter et une ouate pour faire adhérer la lamelle sur les plates-formes latérales, en appuyant légèrement.
- Le quadrillage est rempli par capillarité en déposant une goutte de l'échantillon dilué (40 ul de semence et 360 ul de solution NaCl 4%) à l'aide d'une pipette inclinée sur la plate-forme centrale entre la lamelle et le fond. Le remplissage doit être réalisé en 1 seule fois, sans débordement dans les rainures et sans bulles d'air.
- L'hématimètre est positionné à plat, en "chambre" humide (une boîte de Pétri avec une ouate humide), pendant 5 minutes (10 minutes pour les thrombocytes) afin de laisser les éléments sédimenter. Lors du comptage, en évitant le dessèchement l'échantillon.
- L'observation est réalisée à l'objectif x10, il faut s'assurer que la répartition soit homogène.
- Le comptage des cellules est réalisé selon les modalités décrites dans le chapitre 1.

V.4. Evaluation de la vitalité

V.4.1. Par la coloration de l'éosine-nigrosine

Les étapes sont décrites par la figure 25.



Etape1 : Prendre de l'ependorff chauffé à 37°C dans la platine chauffante, une goutte de sperme dilué 1/10 par l'EB. (40ul de sperme pur + 360ul EB)



Etape2 : Après qu'on a déposé la goutte dans le tube identifié, On vortex.



Etape3 : On dépose une goutte du sperme dilué dans une lame pré-chauffée et identifiée.



Etape4 : On rajoute deux gouttes de l'éosine, on mélange et on attend 30 secondes.



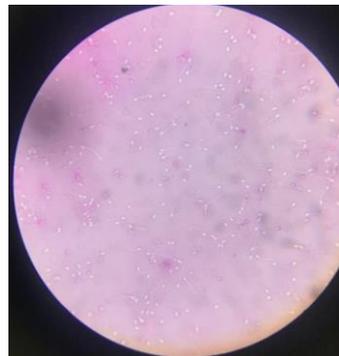
Etape5 : On ajoute 3 gouttes de nigrosine, on mélange et on attend 30 secondes.



Etape6 : On tire un frotti et on laisse sécher à l'air libre.



Etape7 : On Compte 100 cellules (objectif immersion 100x). Sous le microscope Nikon E100-LED.



Etape8 : Exemple de coloration obtenue au microscope avec la coloration éosine-nigrosine.

Figure.24 : Etapes de coloration Eosine-Nigrosine (originale)

V.4.2. Par le test hypo-osmotique

Les étapes sont décrites par la figure 26.



Etape1 : On mélange une goutte de 40ul de sperme pure avec 360ul de solution hypotonique dans un tube à l'aide d'une micropipette.

Etape2 : On mélange à l'aide d'un vortex.

Etape3 : On incube dans l'étuve pendant 45min à 37°C.



Etape4 : On réalise un frotti sur une lame pré -chauffée en la laissant sécher.



Etape5 : Coloration rapide (Diff-Quick), en trempent la lame dans les 3 réactifs en ordre (Fixateur I - Colorant I- Colorant II) pendant 15 seconde. On rince la lame avec l'eau distillé et on la laisse sécher à l'air libre.



Etape6 : Evaluation de 200 spz sous microscope (Objectif x40).

Figure.25 : Etapes de test hypo-osmotique (originale)

VI. Méthodes non conventionnelles

VI.1. Analyse par le CASA

Dans cette technique un analyseur Hamilton Thorne IVOS II (Hamilton Thorne, Lisieux, France) a été utilisé (voir annexe) . Les étapes d'analyse sont démontrées par la figure 28.



Etape1: Prélever 40µl de la semence Pure (dans les premières minutes qui suivent la récolte).



Etape2: Dilution Del 'échantillon de sperme avec de l'easy buffer à 25×10^6 spz/mL.



Etape3 : Homogénéiser la solution.



Etape 4: 20µl de cet échantillon, sont répartis par capillarité dans une des 4 chambres des cellules de Leja de 20 microns de profondeur (IM technologies, Aigle, France) préchauffés à 37°C.



Etape 5: Appuyer sur "LOAD" pour lancer l'analyse.



Etape 6: Le logiciel IMSI STRICT (Hamilton Thorne, Lisieux, France) va calculer les paramètres cinétiques morphologiques. Et les résultats feront apparaître sous forme d'un rapport

Figure.26: Etapes d'analyse par le CASA (originale)

VI.2. Analyses par cytométrie en flux

Le cytomètre utilisé est guava easyCyte HT (IMV Technologies, Aigle, France) (voir annexe) , qui requiert l'utilisation d'un logiciel pilote nommé guavaSoft IMV et d'un kit nommé EasyKit qui doit être stocké à 4°C et protégé des lumières extérieures.

VI.2.1. Analyse de la viabilité

Le cytomètre en flux a été utilisé pour analyser la viabilité des spermatozoides frais aux différents intervalles : T0 et réfrigérés à T48, T96 et T144 pour les cinq éjaculats.

Le principes consiste à effectuer au préalable

- Un lavage avec l'eau distillée, l'eau de javel et une solution de lavage appelée EasyClean. Ceci afin d'éviter l'obturation du capillaire du cytomètre.

Le lavage consiste à ajouter :

- L'eau distillée dans les positions W2, W4 et W5.
- 100µL de l'eau de javel dans la position W1.
- Les positions W3 et W6 tubes vides
- ICF dans la position 10.



Figure. 27: Les différentes positions des tubes pour effectuer un lavage du cytomètre (originale)

1-Un plateau de 96 puits a été retiré du kit qui doit et un puits a été retiré du colis et transférés à la base de travail

2- On ajoute 199 µl d'easy buffer dans le puits.

- 3- On ajoute 1µl de spermatozoïdes à $57 \times 10^6/\text{ml}$ dans le même puits.
- 4- On homogénéise le puits en pipetant et en descendant à l'aide d'une micropipette.
- 5- La plaque est ensuite recouverte par un cache noir pour empêcher la pénétration des rayons lumineux et une incubation est effectuée à 37°C pendant 10 min.
- 6- Sur la première fenêtre qui apparaît sur l'interface du logiciel Cytosoft IMV, le type d'analyse "viabilité" est choisi.
- 7- La plaque est ensuite récupérée de l'incubateur puis placée dans le cymomètre.



Figure.28: Mise de la plaque après 10 min d'incubation dans le cytomètre (originale)

- 8- Après attribuer le nom d'éjaculat aux puits correspondants et enregistrement de fichier généré dans un emplacement choisi sur le microordinateur, l'analyse est lancée.

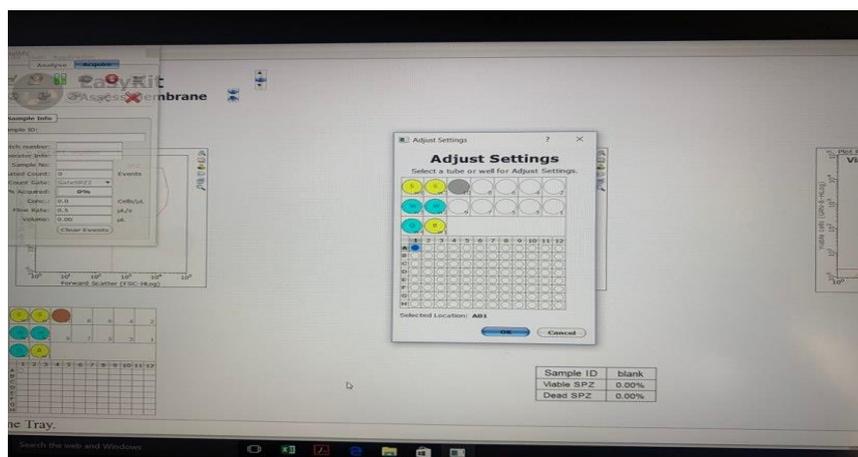


Figure. 29: Ajustassions de position de puits (originale)

9- Une fois l'analyse terminée, les résultats sont récupérés sous forme d'un tableau de données (fichier Excel) et de graphiques correspondants (nuages de points).

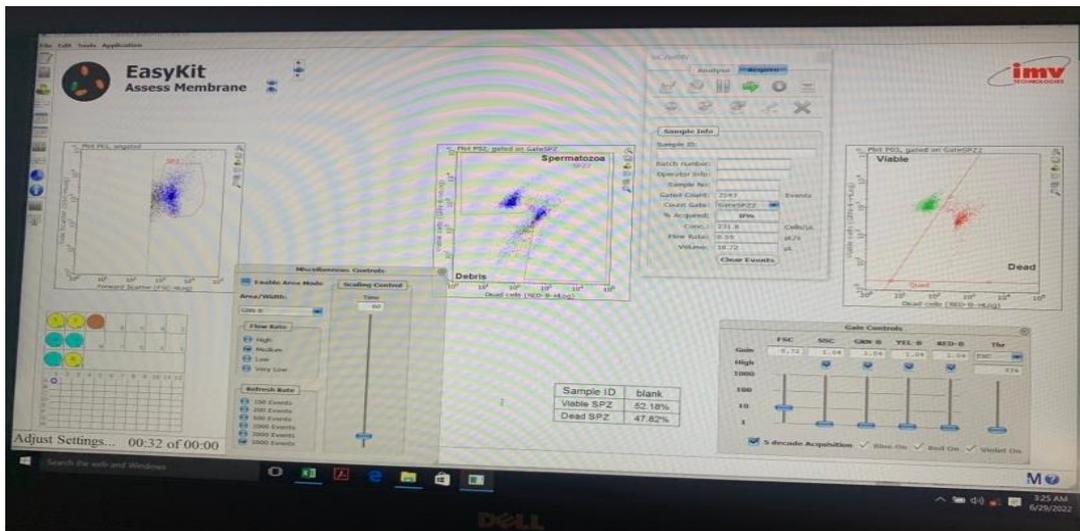


Figure. 30: Ecran du résultat à la fin de l'analyse (originale)

VI.2.2. Analyse de la concentration

Les mêmes étapes décrites ci-dessus sont suivies, pour la concentration, La seule différence est dans l'étape 2 on remplace l'Easy buffer par de l'eau distillé donc on a utilisé 1µl à 57 x10⁶ /ml avec 199µl d'eau distillée sont utilisés.

VII. Méthodes de réfrigération a 4°C

Après un prélèvement d'environ 130ul du volume initial de chaque éjaculat à T0 pour la première analyse de la semence fraîche, On réfrigère le reste du volume dans le tube après une dilution par un milieu de conservation commercialisé, le CanixCell (Milieu de conservation, IMV Technologies, France). Afin d'obtenir un échantillon de volume final concentré à 100.10⁶ spz/mL. Le volume de canixCell ajouté à la fraction spermatique est calculé à l'aide de la concentration donnée par le spectrophotomètre selon la relation décrite ci-dessous.

$$C_0 V_0 = C_1 V_1$$

V_0 : volume initial de la fraction spermatique.

V_1 : volume final de l'échantillon.

C_0 : concentration de la semence déterminée par le spectrophotomètre.

C_1 : concentration finale de l'échantillon = 100.10⁶ spermatozoïde/mL.

$V_{\text{CanixCell}}$: $V_1 - V_0$.



Etape1: Incubation du canixCell et de tube de réfrigération identifié et rempli avec l'eau à 37°C



Etape2: L'ajout de canixCell au sperme pur. Dans une T° de 37°C.



Etape3: La mise de tube de sperme dilué dans le premier tube de réfrigération Afin de le positionner dans la vitrine réfrigérante (IMV Technologies, France) a 4°C.

Figure. 31 : Etapes de réfrigération (originale)

- Pour les 3 analyses après chaque 48h de chaque éjaculat, On prélève 130ul de la semence réfrigéré et on remet le tube dans la vitrine réfrigérante.

CHAPITRE III : RESULTATS

I. Analyse de la variance entre des paramètres

Le modèle analyse de la variance suivi par le test de comparaison multiple (Test du Tukey) ont été utilisés, de manière à étudier la variation quantitative des paramètres définissant la qualité de la semence.

I.1. Analyse de la variance de la motilité massale et individuelle

Les résultats relatifs à la motilité massale et individuelle, sont présentés dans la figure 33. Cette dernière affiche la présence d'une **différence hautement significative** de la **motilité massale** ($p=0.007, p<0.01$). Le graphique montre que la valeur la plus importante de la motilité massale est signalée à (j0) : groupe homogène (a). Cependant les paramètres accusent une **réduction** à partir de j2 jusqu'à la fin de l'expérimentation (j2, j4, j6) : groupe homogène (b). La motilité individuelle entre les différents temps de conservation est **hautement significative** ($p=0.004, p<0.01$). Le graphique montre que la valeur la plus importante de la motilité individuelle est signalée à (j0) : groupe homogène (a), **une réduction** est observée à partir de j2 jusqu'à j6: groupe homogène (b).

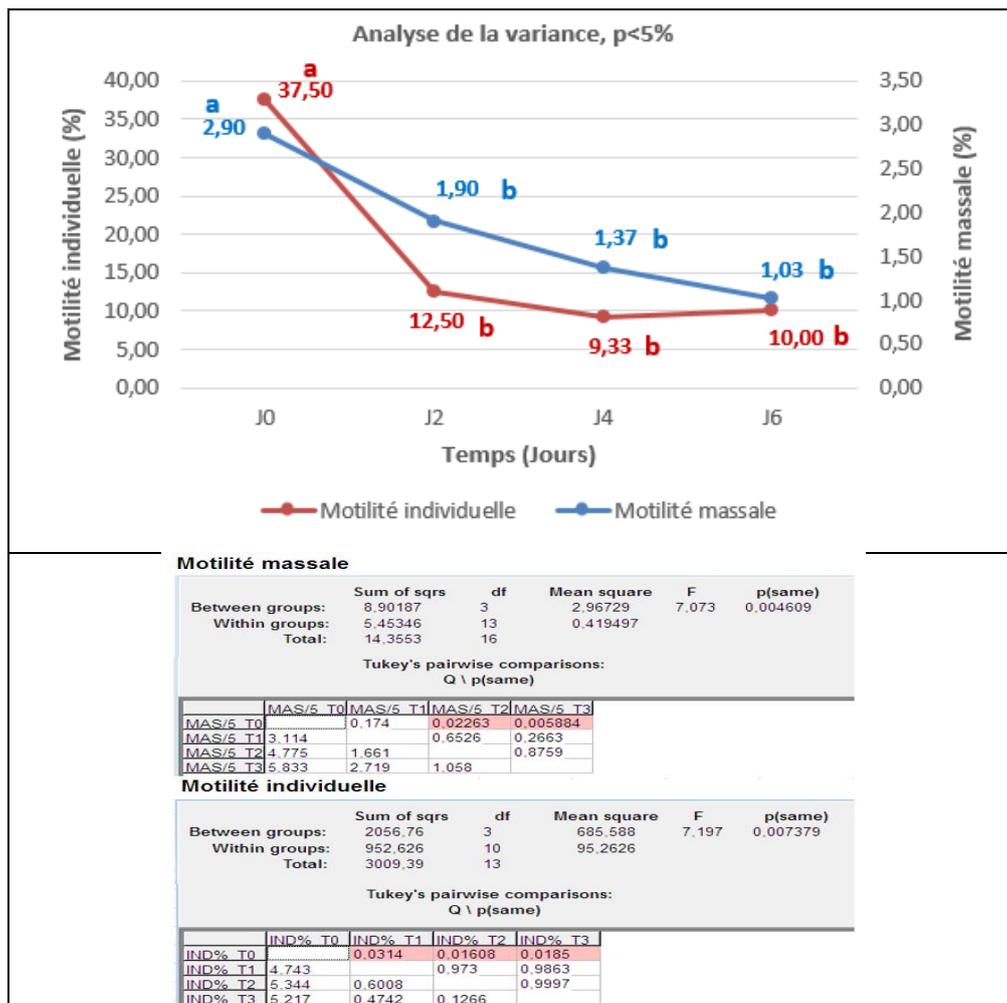


Figure .32: Analyse de la variance one way-ANOVA de la motilité massale et individuelle en fonction de différents intervalles de temps

I.2. Analyse de la variance de la vitalité

Les résultats de la vitalité des spermatozoïdes par le test host et la coloration Eosine-Nigrosine sont démontrés dans la figure 34. La réduction de la vitalité dans les deux testes est **très hautement significative** ($p=1.345 \times 10^{-6}$, $p<0.0001$) pour le test Eosine-Nigrosine, et **significatif** pour ($p= 0.007$, $p<0.001$) pour le test de Host. Les valeurs les plus importantes de vitalité sont signalées à (j0) : groupe homogène (a). Cependant les paramètres accusent une **réduction** à partir de j2 jusqu'à la fin de l'expérimentation (j2, j4, j6) : groupe homogène (b).

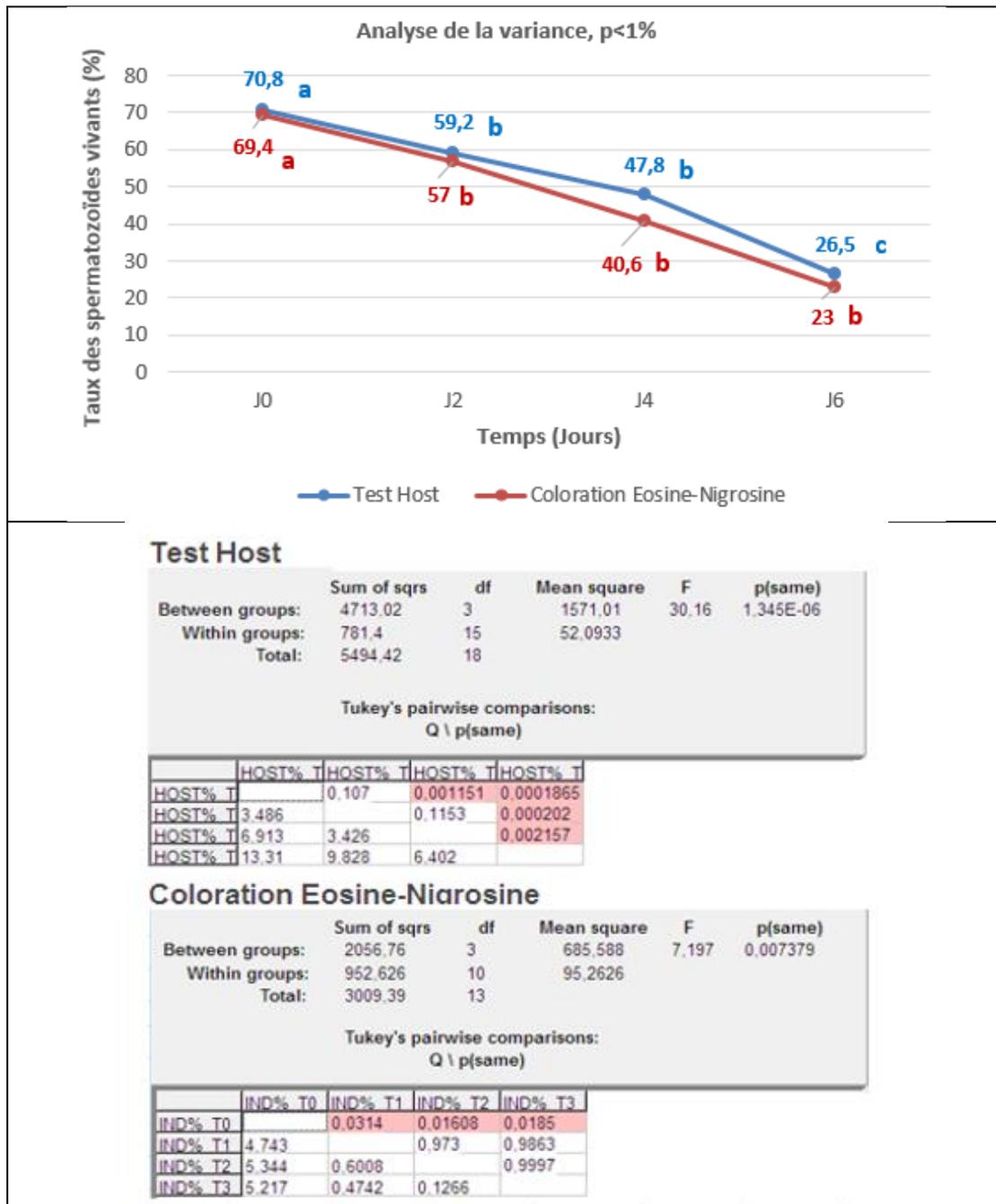


Figure .33: Analyse de la variance one way-ANOVA de la vitalité en fonction des différents intervalles de temps

I.3. Analyse de la variance du type de motilité

Les résultats relatifs aux types de motilités, sont présentés dans la figure 35. Cette dernière montre, que le % de spermatozoïdes mobiles est réduit à partir de J2 avec une différence **très hautement significative** ($p=0.0006$, $p<0.001$). Les valeurs les plus importantes sont enregistrées dans le groupe homogène (a). La **réduction du %** est observée à partir de J4 jusqu'à la fin de l'expérimentation: groupe homogène (b).

La différence de la **motilité progressive** entre J0 et les intervalles restants est **très hautement significative** ($p=0.0007$, $p<0.001$). Le graphique montre que la valeur la plus importante de **motilité progressive** est signalée à (j0) : groupe homogène (a). Cependant les paramètres accusent une **réduction** à partir de j2 jusqu'à la fin de l'expérimentation (j2, j4, j6) : groupe homogène (b).

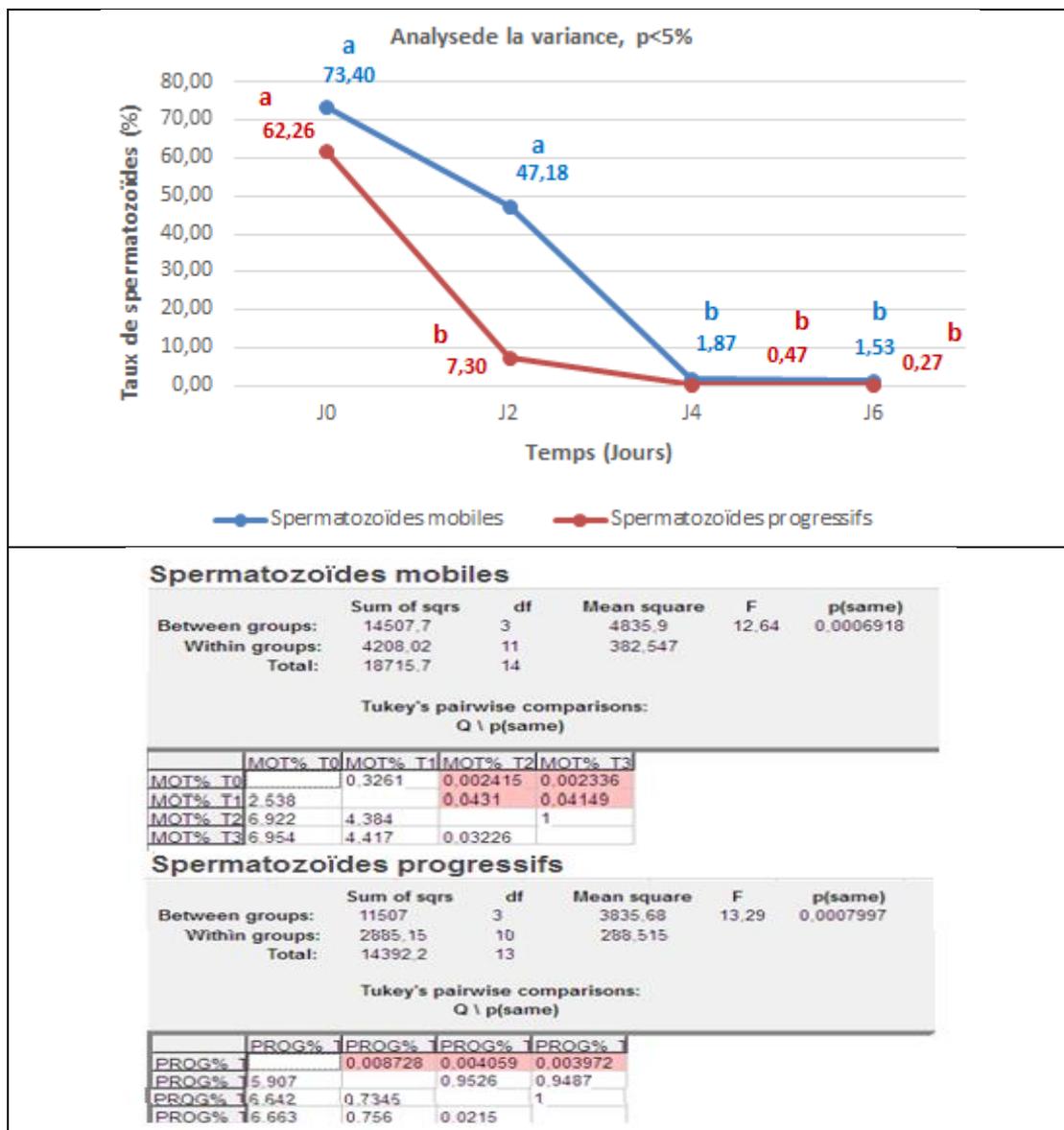


Figure .34: Analyse de la variance one way-ANOVA du type de motilité en fonction de différents intervalles de temps

I.4. Analyse de la variance de l'amplitude du déplacement latérale de la tête et la fréquence de croisement des battements

La figure 36 présente l'analyse de la variance de l'amplitude latérale de déplacement de la tête des spermatozoïdes, ce graphe représente des données contradictoire les mesures expérimentales doivent être reproduites pour vérifier la variance en fonction du temps. Pour ce qui est de la **fréquence des battements** la différence entre J0 jusqu'à j6 n'est **pas significative** ($p=0.24$, $p>5\%$).

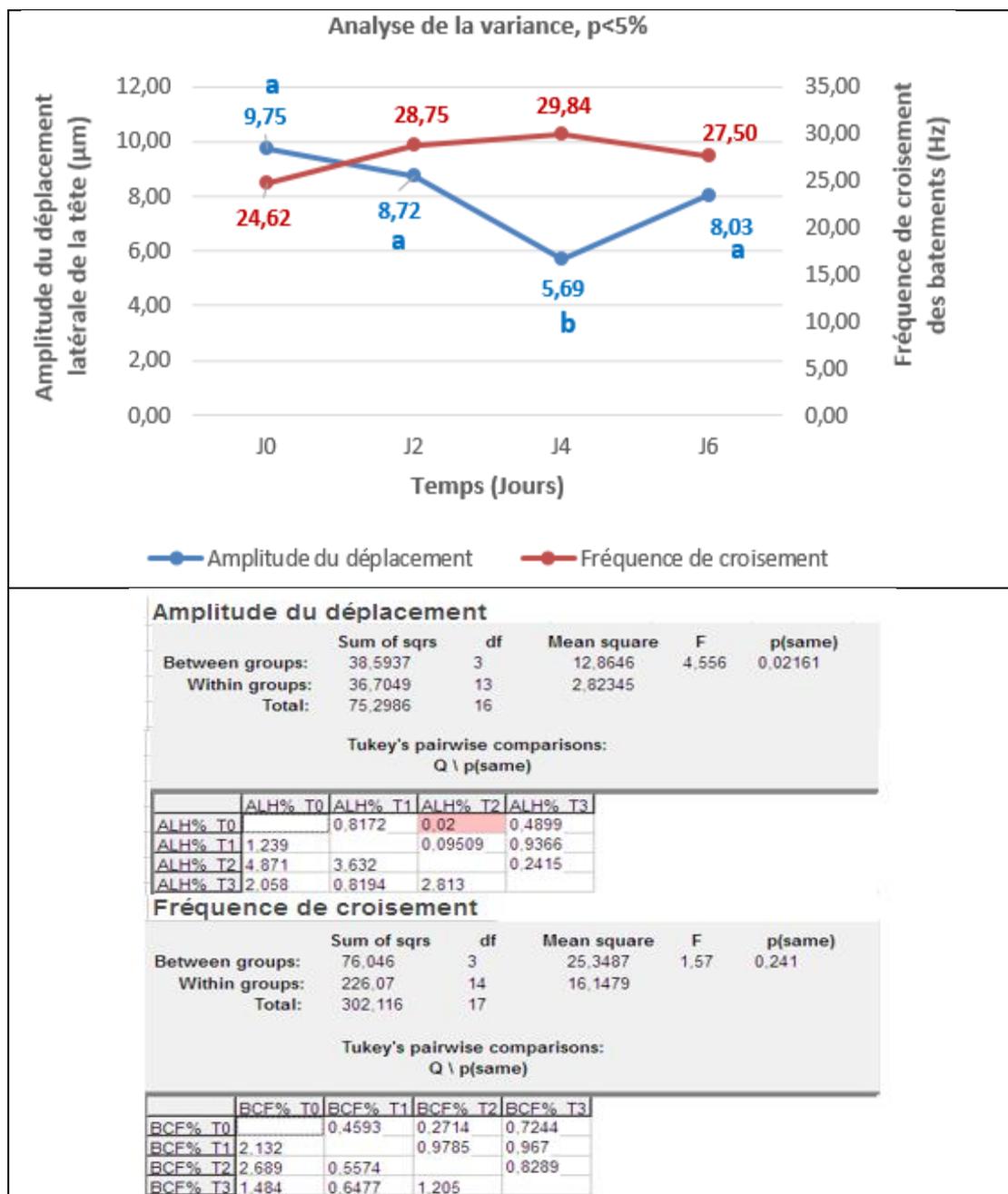


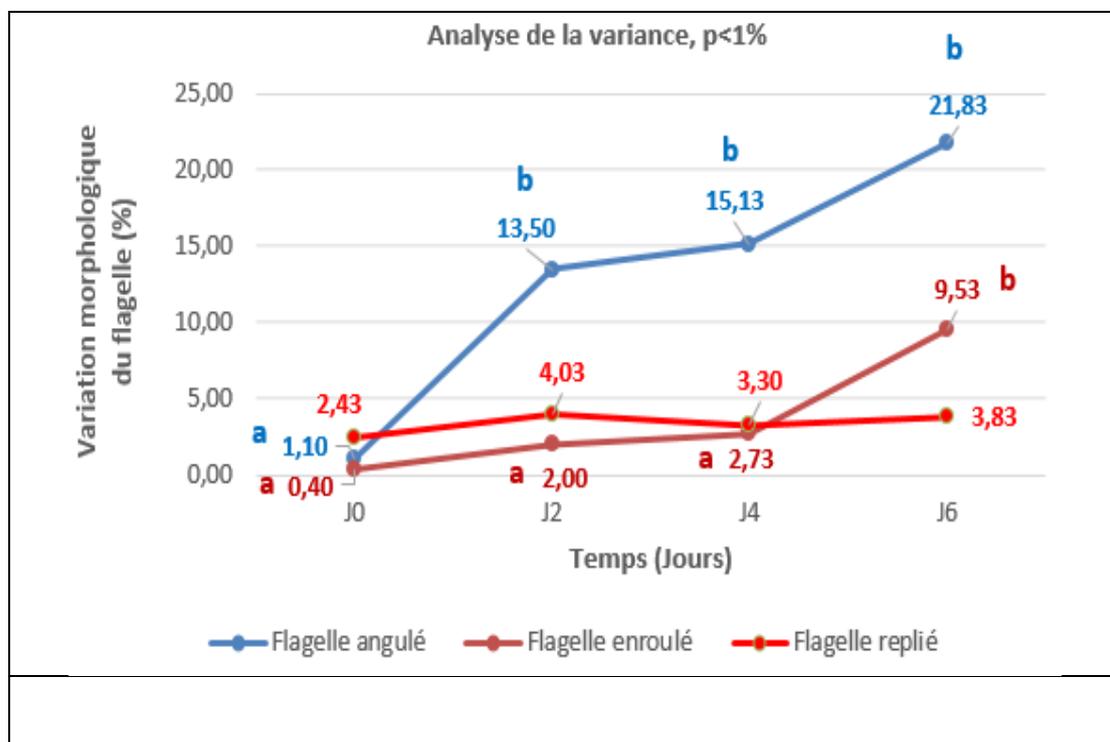
Figure. 35: Analyse de la variance one way-ANOVA de l'amplitude du déplacement latérale de la tête et la fréquence de croisement des battements aux différents intervalles de temps

I.5. Analyse de la variance de la morphologie du flagelle

Les résultats relatifs à la morphologie du flagelle, sont présentés dans la figure 38. Pour l'aspect angulé du flagelle la **différence est hautement significative** ($p=0.002$, $p<0.01$). Le taux augmente significativement à partir du **J2**. Le graphique montre que la valeur la plus basse de ce type est signalée à (**j0**) : groupe homogène (**a**). Cependant les paramètres accusent une hausse à cet aspect à partir de j2 jusqu'à la fin de l'expérimentation (j2, j4, j6) : groupe homogène (**b**).

Pour le flagelle enroulé la **différence est très hautement significative** ($p=9.10 \times 10^{-5}$, $p<0.0001$). Le taux augmente significativement à partir du **J4**. Le graphique montre que la valeur la plus basse de ce type est signalée à (**J0, J2, J4**) : groupe homogène (**a**). Cependant les paramètres accusent une hausse à partir de J6 : groupe homogène (**b**).

Pour le flagelle replié il la hausse n'est pas significative ($p=0.267$, $p>5\%$)



Flagelle angulé						
	Sum of sqrs	df	Mean square	F	p(same)	
Between groups:	678,01	3	226,003	8,893	0,002805	
Within groups:	279,554	11	25,414			
Total:	957,564	14				
Tukey's pairwise comparisons: Q \ p(same)						
	BENT% T	BENT% T	BENT% T	BENT% T		
BENT% T		0,03131	0,01527	0,001059		
BENT% T	4,655		0,9719	0,1797		
BENT% T	5,265	0,6101		0,332		
BENT% T	7,784	3,129	2,519			
Flagelle enroulé						
	Sum of sqrs	df	Mean square	F	p(same)	
Between groups:	148,765	3	49,5885	26,01	9,101E-05	
Within groups:	17,1582	9	1,90647			
Total:	165,924	12				
Tukey's pairwise comparisons: Q \ p(same)						
	COILED%	COILED%	COILED%	COILED%		
COILED%		0,4941	0,2127	0,000265		
COILED%	2,073		0,9052	0,0005105		
COILED%	3,023	0,9501		0,0008824		
COILED%	11,83	9,76	8,809			
Flagelle replié						
	Sum of sqrs	df	Mean square	F	p(same)	
Between groups:	5,95167	3	1,98389	1,505	0,2676	
Within groups:	14,5017	11	1,31833			
Total:	20,4533	14				
Tukey's pairwise comparisons: Q \ p(same)						
	DMR% T0	DMR% T1	DMR% T2	DMR% T3		
DMR% T0		0,2852	0,7332	0,3846		
DMR% T1	2,678		0,826	0,9957		
DMR% T2	1,464	1,213		0,9199		
DMR% T3	2,357	0,3208	0,8926			

Figure. 36: Analyse de la variance one way-ANOVA de la morphologie du flagelle aux différents intervalles de temps

CHAPITRE IV : DISCUSSION

Dans notre étude, les éjaculats avaient des concentrations moyennes à faible en spermatozoïdes et des mobilités normales, dans cette partie, nous discuterons l'influence de la réfrigération en fonction du temps sur les caractéristiques de la semence canine.

Le premier résultat que nous pouvons noter est la mobilité des spermatozoïdes après 48 heures de réfrigération. En effet le pourcentage des spermatozoïdes mobile a diminué. Ce résultat est en accord avec celui de Adoue qui trouve qu'il y a une diminution de la mobilité après 24 heures de stockage à +4°C (Adoue, 1991). La perturbation de la membrane plasmique due au refroidissement ou à la congélation détermine la perte de cations et d'enzymes des spermatozoïdes, ce qui explique en partie la réduction de la motilité et de l'activité métabolique des spermatozoïdes observée chez les spermatozoïdes ayant subi un choc froid. Le choc froid détruit également la perméabilité sélective des membranes des spermatozoïdes au calcium, ce qui conduit à son accumulation intracellulaire excessive et, par conséquent, à une réduction de la motilité et à la nécrose cellulaire.

Les résultats de la vitalité des spermatozoïdes par le test host et la coloration Eosine-Nigrosine démontrent l'intégrité membrane de la tête pour l'éosine nigrosine et flagellaire pour le test Host. La réduction de la vitalité dans les deux testes est significatives. Nous avons trouvé dans les échantillons de sperme refroidi de J0 à j4, un nombre plus élevé de spermatozoïdes avec des membranes plasmatiques intactes par rapport à ceux avec des membranes détruites, ce résultat est en accord avec les observations rapportées par **Vasconcelos et al., 2011**.

Concernant l'analyse de la variance du spermatozoïde mobile et progressif, **Iguer-Ouada et Verstegen (2001b)** ont analysé le sperme de 42 Beagles fertiles, directement après le prélèvement, en utilisant l'IVOS 10 de Hamilton Thorne. Ils ont obtenu un âge moyen de 89 % de spermatozoïdes mobiles avec un minimum de 73% sur le sperme frais. Ce qui est presque similaire avec nos résultats des spermatozoïdes mobile a j0 obtenus par l'IVOS II de Hamilton throne. De j2 à J6 l'analyse montre, que le % de spermatozoïdes mobiles et progressif est réduit à partir de J2 avec une différence significative. La relation fonctionnelle entre la mitochondrie et l'appareil cellulaire qui dirige les mouvements des spermatozoïdes est bien connue ; en effet, les mitochondries sont connues pour produire de l'énergie sous forme d'ATP et la mobilité des spermatozoïdes dépend de l'énergie produite par la phosphorylation oxydative. Les mitochondries sont une source majeure d'espèces réactives de l'oxygène et semblent être les

structures cellulaires les plus susceptibles d'être endommagées pendant le refroidissement ce qui entraîne une perte de motilité dans le sperme.

Si on essaye de comparer nos données avec celles de la littérature, on trouve que plusieurs études ont démontré une corrélation entre la mobilité et la fertilité de la semence (**Bongso et al., 1989; Verstegen et al., 2002**). On ne peut pas encore dire avec certitude quels paramètres de mobilité mesurés avec l'analyseur d'images nous donne la meilleure prédiction de la fertilité de la semence.

Les résultats de l'amplitude latérale de déplacement de la tête des spermatozoïdes, présente des données contradictoire à cause de l'augmentation du pourcentage de j4 a j6. Cependant, nous savons que si ALH est augmentée cela signifie que la réaction acrosomique s'est produite. En conséquence, la fécondation est impossible, ce qui contraste avec notre tendance où l'ALH serait plus élevée chez les chiens fertiles. D'où l'importance de vérifier ces tendances sur une étude avec plus de chiens.

Les résultats relatifs à la concentration mesurés par la cytométrie en flux et le taux des spermatozoïdes normaux, montrent, que la diminution enregistrée dans la concentration des spermatozoïdes entre les intervalles de temps de spermatozoïdes, n'est pas significative, ce qui est logique en sachant que la concentration ne change pas en fonction du temps de réfrigération. De même que pour le taux des spermatozoïdes normaux qui a augmenté légèrement, on peut lier ça à l'influence du froid sur la cellule spermatique.

Enfin, Les résultats relatifs à la morphologie du flagelle mesurer par le système CASA, ont montrés l'aspect angulé du flagelle (BENT), la différence est hautement significative. Le taux augmente significativement à partir du J2.

Pour le flagelle enroulé (COILED) la différence est très hautement significative. Le taux augmente significativement à partir du J4.

Cela peut être justifié par les altérations qui peuvent occasionner les échantillons pendant la manipulation et qui s'expriment par des anomalies mineures.

Pour le flagelle replié (DMR), la hausse n'est pas significative ce qui signifie que le système CASA peut être influencé par plusieurs artefacts liés à des réglages inappropriés et des erreurs techniques.

Conclusion et perspectives

Au cours des dernières années la réfrigération des spermatozoïdes a donné lieu à un nombre imposant de travaux permettant d'améliorer nos connaissances en matière de conservation in vitro du sperme. L'objectif de notre travail était de détailler les différentes étapes de la réfrigération de la semence canine, en y incluant les techniques de récolte et l'évaluation de la semence en état frais et réfrigéré avec plusieurs techniques conventionnelles et récentes. En effet, bien que l'évaluation du sperme avec les méthodes conventionnelles sont considérée comme des méthodes de référence, il a été montré que les méthodes plus récentes, comme la cytométrie en flux et le système CASA, présentent une meilleure rentabilité grâce à leur facilité, leur rapidité et leur précision sauf qu'une meilleure maîtrise de l'utilisation est nécessaire afin d'obtenir des résultats fiables. Notre étude nous a permis de savoir que la réfrigération à 4°C est un processus qui conserve les spermatozoïdes mais pas pour une longue durée vu l'effet du froid sur le spermatozoïde qui a entraîné une diminution de tous les taux des paramètres mesurer ce qui peuvent nuire à la fertilité des spermatozoïdes sachant que certaines semences supportent moins bien le froid que d'autres. Il est donc important de mettre en évidence l'âge des chiens qui donne une qualité de semence optimale lorsqu'ils sont encore jeunes .De nombreux protocoles sont aujourd'hui décrits sans qu'aucun ne s'avère significativement supérieur, De ce fait, de nombreuses études restent encore à réaliser afin d'améliorer l'efficacité des protocoles et les techniques d'évaluation de la semence.

Références bibliographiques

A

- Astorgis, B.,(2015). Etude de la fertilité in vitro et in vivo de la semence congelée à l'aide d'un dilueur à base de liposomes 6% dans l'espèce canine Thèse de Doctorat vétérinaire.faculté de médecine de Nantes, ONIRIS . Ecole Nationale Vétérinaire, Agroalimentaire et de l'Alimentation Nantes-Atlantique, Nantes, France.p.98.
- Auger J., Eustache F. Standardisation de la classification morphologique des spermatozoïdes humains selon la méthode de David modifiée. Andrologie N°4. 2000, p.358-373.

B

- Briffaut As (2007). Congélation de la semence canine : détermination de la combinaison optimale de quatre facteurs différents. Thèse pour le doctorat vétérinaire. l'Université Paul-Sabatier de Toulouse.p.107

C

- Cabannes CR (2008). Comparaison des méthodes d'évaluation de la qualité de la semence dans les espèces bovine, canine et humaine. Thèse de doctorat vétérinaire. Université PaulSabatier ,Toulouse.p.58.
- Cambournac, M. (2012). Apport de la cytométrie en flux dans la reproduction des carnivores domestiques. Thèse de Doctorat vétérinaire. Faculté de médecine de Lyon,Lyon.p.50.
- Cheuquemaín C, Bravo P, Treuleín F, Giojalas LC, Villegas J, Saínchez R, Risopatroín J. Sperm membrane functionality in the dog assessed by flow cytometry. *Reprod domest Anim* . 2012,39–43.

D

- Dean, J.M., Lodhi, I.J., . Structural and functional roles of ether lipids. *Protein Cell* 9.2018, 196–206
- Diaz, J., Tainturier D., Topie E., Michaud S., Amirat-Briand L., Bencharif D,. Could the liposomes be an alternative to egg yolk in canine semen freezing?. *Reproduction in Domestic Animals*.2014.49.

- Dott, H.M., Foster, G.C.A. The estimation of sperm motility in semen, on a membrane slide, by measuring the area change frequency with an image analysing computer. *Reproduction* 55.1979, 161–166.
- Dumon, C., 2008. Conduite diagnostique de l'infertilité chez le chien. *Actual. En Reprod. Chien Chat*.

F

- Feldman E.c., Nelson R.w. Disorders of the canine male reproductive tract, In : *Canine and feline endocrinology and reproduction Philadelphia, W.B. Saunders compagny.1987,pp. 481- 524.*
- Feldman, E. C., & Nelson, R. W. Disorders of the canine male reproductive tract. *Canine and feline endocrinology and reproduction. W.B. Saunders compagny. P hiladelphia.1987. 481- 524.*
- Fontbonne A. Physiologie sexuelle du chien mâle, In: *Les, indispensables de l'animal de compagnie. Reproduction du chien et du chat. PMCAC Edition, Paris ,J.P. (Eds.) 1992, pp. 19-26.*
- Fontbonne A., Buff S., Garnier F. Données récentes en physiologie et endocrinologie sexuelles dans l'espèce canine. *Le point vétérinaire, 2000, 209, 27-32.*
- Fontbonne, A., Buff, S., & Garnier, F. Données récentes en physiologie et endocrinologie sexuelles dans l'espèce canine. *Le point vétérinaire. 2000, 209, 27-32.*
- Freshman J.L. Semen collection and evaluation. *Clin. Tech. Small Anim. Pract. 2002, 104-107.*

G

- Garner DL, Johnson L A. Viability assessment of mammalian sperm using SYBR14 and Propidium Iodide. *Biol Reprod. 1995, 276–284.*
- Gavin-Plagne, L(2018). *Cryoconservation de cellules spermatiques et de cellules souches pluripotentes de mammifères dans un milieu synthétique et chimiquement défini .Thèse pour le doctorat vétérinaire, Université de Lyon. p.313*
- Gilman-Sachs, A. Flow cytometry. *Anal. Chem. 1994, 700–707.*
- Gravance, C., Champion, Z., Casey, P. Computer-assisted sperm head morphometry analysis (ASMA) of cryopreserved ram spermatozoa. *Theriogenology .,1994, 1219–1230.*

- Gravance, C., Champion, Z., Casey, P., 1998. Computer-assisted sperm head morphometry analysis (ASMA) of cryopreserved ram spermatozoa. *Theriogenology* .1998, 1219–1230.

H

- Hildebrandt TB, Hermes R, Colleoni S, Diecke S, Holtze S, Renfree MB, et al. Embryos and embryonic stem cells from the white rhinoceros. *Nature Communications*. 2018,258-260.
- Holmes E. On osmolality and sperm function during processing for assisted reproduction [Academic]. Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden,2020.
- Hossain A, Rizk B, Barik S, Huff C, Thorneycroft IH. Time course of hypo-osmotic swellings of human spermatozoa: evidence of ordered transition between swelling subtypes. *Hum Reprod*. 1998,78-83.

I

- Iguer-Ouada, M., Verstegen, J. Long-term preservation of chilled canine semen: effect of commercial and laboratory prepared extenders. *Theriogenology* .2001, 671–681.

J

- Jeyendran R, Van der Ven H, Perez-Pelaez M, Crabo B, Zaneveld L. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J Reprod Fertil*.1984,219-28.
- Johnston S.d., Root Kustritz m.V., Olson P. Semen Collection, Evaluation, and preservation. In: *Canine and feline theriogenology*. W. Saunders compagny. Philadelphia, Johnston S.D. (Eds.)2001,pp. 287- 306.

K

- Kabera F. (2008). Appréciation 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 sciences et médecine vétérinaires de Dakar.p.45.
- Karlsson Jom, Toner M. Long-term storage of tissues by cryopreservation. *Critical issues Biomaterials*. 1996, 356,17-24.

- Kirkman-Brown J, Bjorndahl L. Evaluation of a disposable plastic Neubauer counting chamber for semen analysis. *Fertil Steril*. 2009,627-31.
- Kutzler M. Semen collection in the dog. *Theriogenology*. 2005 ,802, 747-754.

L

- Linde-Forsberg C. Artificial insemination with fresh, chilled extended and frozen-thawed semen in the dog. In: *Seminars in Veterinary Medicine and Surgery*. 1995, pp.48-58.
- Lu, J.C., Huang, Y.F. and Lü, N.Q. Computer-aided sperm analysis past, present and future. *Andrologia*. 2014, 329-338.

M

- Millette, C. Spermatozoa In: *Encyclopedia of reproduction*. Academic press San Diego, Knobil E; Neill J.D. (Eds.)1998, pp. 586-596
- Mortimer D, Mortimer S, editors. Routine application of CASA in human clinical andrology and ART laboratories. 13th International Symposium on Spermatology. 2018.20-24.

O

- Ott, R.s., Goffaux, M., Thibier, M. Examen morphologique des spermatozoïdes, in: *Insémination et Élevage*. 1987, pp. 15-20.

P

- Prins G.s . *Encyclopedia of reproduction Volume 4*. Academic press, San Diego, Knobil E, Neill J.D. (Eds.) 1998, pp 360-367

R

- 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. p.30.
- Rijsselaere T, Van Soom A, Maes D, de Kruif A. Effect of centrifugation on in vitro survival of fresh diluted canine spermatozoa. *Theriogenology* .2002, 1669– 1681.
- Rijsselaere, T., Van Soom, A., Tanghe, S., Coryn, M., Maes, D., de Kruif, A. New techniques for the assessment of canine semen quality, A review. *Theriogenology*, *Theriogenology* .2005, 706–719.
- Rjsselaere T, Van Soom A, Tanghe S, Coryn M, Maes D, de Kruif A. New techniques for the assessment of canine semen quality a review. *Theriogenology*.2005, 706– 719.

- Ronot, xavier, Grunwald, D., Mayol, J.-F., Boutonnat, J., 2006. La cytométrie en flux, Éditions Tec & doc. ed, Lavoisier. Paris.
- Rukundo J. (2009). Evaluation des résultats de l'insémination artificielle bovine dans le département de Mbour : cas du projet Goana. Thèse de doctorat, Université cheikh antadiop de dakar, Sénégal.p.30.

S

- Shapiro, H.M. Practical Flow Cytometry. John Wiley & Sons.2005 ,25-27.
- Strom, B., Rota, A., & Linde- Forsberg, C. In vitro characteristics of canine spermatozoa subjected to two methods of cryopreservation. Theriogenology.1997, 247-256.

T

- Talarczyk-Desole, J., Berger, A., Taszarek-Hauke, G., Hauke, J., Pawelczyk, L. and Jedrzejczak, P. Manual vs. computer-assisted sperm analysis can CASA replace manual assessment of human semen in clinical practice?. Ginekologia Polska. 2017, 56-60.
- These-file:///C:/Users/pc/Downloads/VERNET_Nadege_2006.pdf
- Tourrel-Cuzin ,C Boutant M, Ramos OHP, Movassat J, Ilias A, et al. (2012) .Controls Mouse Pancreatic β -Cell Mass through GLP-1- β -Catenin Signaling Pathways. Disponibles sur: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.003084> (pages consultées le 9/06/2022).

U

- University of Aberdeen, 2010. Flow cytometry Analysis of fluorescence Proteins [Internet]. Int. Genet. Eng. Mach. Found. Disponible sur : http://2010.igem.org/FACS_analysis_of_fluorescent_proteins (pages consultées le 15/06/2022).

V

- Vasconcelos AB, Santana MA, Santos AMC, Santoro MM, Lagares MA (2011) Metabolic evaluation of cooled equine spermatozoa. Andrologia 42: 106–11.
- Verstagen J, Onclin K. et Iguer-Ouada M. Long-term motility and fertility conservation of chilled canine semen using egg yolk added Tris- glucose extender in vitro and in vivo studies. Theriogenology,2005,802, 720-733.

- Verstegen, J.P., Onclin, K. & Iguer Ouada M. Long term motility and fertility conservation of chilled canine semen using egg yolk added Tris- glucose extender: in vitro and in vivo studies. *Theriogenology*.2005, 720--733.
- Verstegen, J. Iguer-ouada, M. Onclin, K. Computer assisted semen analyzers in andrology and veterinary practice. *Theriogenology*.2002, 149–179.

W

- WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen, Sixth Edition © World Health Organization, 2021.
- Withers L. A., Engelmann F. *In vitro* conservation of plant génétique ressources. In :Biotechnology in Agriculture. New York, altman.s.d(Eds.) 1998,pp. 57-88.

Y

- Yan, X.; Dong, L.; Liu, Y.; Yang, F.; Tan, K.; Li, J.; Chang, D.; Yu, X. Effects of physical exercises on semen quality and reproductive outcomes in male infertility: A protocol for systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Med. Bağım*. 2019, 98-90.

ANNEXE



Figure 1: CASA.Hamilton IVOS II.



Figure 2: La lame Leja utilisée par le système CASA .

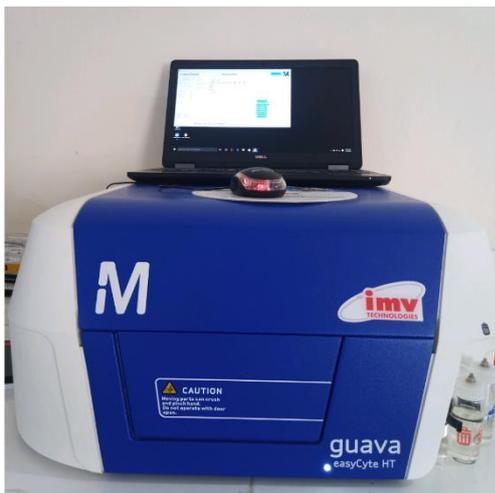


Figure 3:Le cytomètre guava easyCyte HT IMV.



Figure 4: Easykit viabilité et concentration.

TEMPS	EJACULAT	MAS/5_TO	IND%_TO	HOST%_TO	EN%_TO	MOT%_TO	PROG%_TO	VCL%_TO	VAP%_TO	VSL%_TO	LIN%_TO	STR%_TO	WO8%_TO	ALH%_TO	BCF%_TO	TOC10%_TO	YTOV%_TO	TDRMAUX%_TO	BENT%_TO	OILED%_TO	TDMR%_TO	
TO	EJ01	3,00	40	77	80	92,1	83,9	243,18	149,7	134,91	56,19	89,44	62,34	9,38	29,27	341,6	82,48	95,8	0,7	0,5	2,4	
TO	EJ02	4	20	75	68	89,9	80,5	280,78	132,74	118,99	57,1	90,48	62,8	10,36	19,74	421	56,5	97,1	0,9	0,2	1,8	
TO	EJ03	3	60	67	71	36,7	26,7	243,09	114,47	95,06	36,38	74,31	46,11	10,75	27,81	233	31,34	80	1,7	0,5	3,3	
TO	EJ04	2	30	70	66	90,1	80	240,64	137,01	119,85	51,93	87,41	58,88	10,8	21,75		33,48	95			2,2	
TO	EJ05	2,5		65	62	58,2	40,2	154,03	81,86	69,51	46,68	83,69	54,99	7,45	24,51		42,08	61,5				
	My	2,9	37,5	70,8	69,4	73,4	62,26	232,344	123,156	107,664	49,656	85,066	57,024	9,748	24,616	331,867	49,176	85,88	1,1	0,4	2,425	
	SE	0,331662	8,53913	2,2891	3,02655	11,1327	11,9726	20,9533	11,7669	11,4754	3,79728	2,9285	3,06854	0,628549	1,78692	54,4887	9,42772	6,84262	0,305505	0,1	0,317214	
	CV	0,11436621	0,2277101	0,03233192	0,04361	0,151672	0,1923	0,090182	0,095545	0,106585	0,076472	0,034426	0,053811	0,06448	0,072592	0,164188	0,191714	0,079677	0,277732	0,25	0,13081	
TEMPS	EJACULAT	MAS/5_T1	IND%_T1	HOST%_T1	EN%_T1	MOT%_T1	PROG%_T1	VCL%_T1	VAP%_T1	VSL%_T1	LIN%_T1	STR%_T1	WO8%_T1	ALH%_T1	BCF%_T1	TOC10%_T1	YTOV%_T1	TDRMAUX%_T1	BENT%_T1	OILED%_T1	TDMR%_T1	
T1	EJ01	2,5	10	61	61	31,9	9,6	185,06	61,66	44,97	31,15	70,56	42,53	6,66	34,03	341,6	50,68	75,5	14,9	3,2	4,3	
T1	EJ02	3	10	55	53	64,8	8,4	188,53	96,71	74,52	41,41	75,8	53,63	9,78	23,42	421	43,6	82,6	11,7	1,4	3,9	
T1	EJ03	2	10	55	60	21,7	3,9	37,72	82,73	55,09	29,72	67,42	44,27	8,49	29,08	233	41,23	84,5	9,6	1,6	2,7	
T1	EJ04	1	20	61	60	70,3		204,07	34,03	33,47	30,88	98,54	91,98	9,1	29,2	141	73,28	77,8	13,2	1,8	5,2	
T1	EJ05	1		64	51				88,18	65,41		71,96	42,77	9,55	28,04		67,32	59,9	18,1			
	My	1,9	12,5	59,2	57	47,175	7,3	153,845	72,662	54,692	33,29	76,856	55,036	8,716	28,754	284,15	55,222	76,06	13,5	2	4,025	
	SE	0,4	2,5	1,8	2,07364	11,999	1,73494	38,9283	11,256	7,25629	2,7438	5,58551	9,45938	0,559165	1,68971	61,3302	6,41845	4,35024	1,44326	0,408248	0,518612	
	CV	0,21052632	0,2	0,03040541	0,03638	0,254351	0,237663	0,253036	0,154909	0,132676	0,081838	0,072675	0,171876	0,064154	0,058764	0,215837	0,11623	0,057195	0,106908	0,204124	0,128848	
TEMPS	EJACULAT	MAS/5_T2	IND%_T2	HOST%_T2	EN%_T2	MOT%_T2	PROG%_T2	VCL%_T2	VAP%_T2	VSL%_T2	LIN%_T2	STR%_T2	WO8%_T2	ALH%_T2	BCF%_T2	TOC10%_T2	YTOV%_T2	TDRMAUX%_T2	BENT%_T2	OILED%_T2	TDMR%_T2	
T2	EJ01	1,5	10	39	35	1,5	0,2	110,53	40,35	26,91	28,03	65,87	40,82	6,75	23,85	341,6	21,54	79,1	11,7	2,5	2,9	
T2	EJ02	1,4	8,01	52	42	2,7	0,4	106,54	57,71	43,56	47,33	75,01	59,31	5,31	33,98	421	63,46	79,7	10,8	2,9	4,6	
T2	EJ03	1,2	9,989	40	33	1,4	0,8	151,65	66,96	47,25	31,93	70,44	44,53	6,75	30,43	233	50,88	80	14,9	2,8	4	
T2	EJ04			58	53			112,87	30,8	21,86	19,37	70,97	27,29	3,95	32,06	141	66,59	74,9	23,1		1,7	
T2	EJ05			50	40						35,96	61,2	54,44		28,86		47,83	53,4				
	My	1,36667	9,333	47,8	40,6	1,86667	0,466667	120,398	48,955	34,895	32,524	68,698	45,278	5,69	29,836	284,15	50,06	73,42	15,125	2,73333	3,3	
	SE	0,0881917	0,661508	3,63868	3,50143	0,417665	0,154785	10,4991	8,1878	6,2008	4,6076	2,36913	5,58946	0,672012	1,72129	61,3302	7,97445	5,08915	2,80011	0,120185	0,63901	
	CV	0,06453035	0,0708784	0,07612301	0,086242	0,223749	0,331682	0,087203	0,167252	0,177699	0,141668	0,034486	0,123448	0,118104	0,057692	0,215837	0,159298	0,069316	0,185131	0,04397	0,193639	
TEMPS	EJACULAT	MAS/5_T3	IND%_T3	HOST%_T3	EN%_T3	MOT%_T3	PROG%_T3	VCL%_T3	VAP%_T3	VSL%_T3	LIN%_T3	STR%_T3	WO8%_T3	ALH%_T3	BCF%_T3	TOC10%_T3	YTOV%_T3	TDRMAUX%_T3	BENT%_T3	OILED%_T3	TDMR%_T3	
T3	EJ01	1	10	16	18	2	0,4	142,6	60,1	36,2	29,3	69,27	41,49	11,19	22,12	341,6	23,57	60	15	12,5	4,5	
T3	EJ02	1,0097	10,005	40	37	1	0,1	156,86	72,78	48,84	32,66	67,62	47,8	7,5	29,07	421	68,2	43,8	31,3	9	2	
T3	EJ03	1	9,996	30	27	1,6	0,3	136,7	42,42	24,54	31,33	43,82	59,18	5,41	31,3	233	32,61	89,2	19,2	7,099	5	
T3	EJ04	1,098		20	10											141	39,39	84,4				
T3	EJ05																	58,7				
	My	1,02693	10,0003	26,5	23	1,533333	0,266667	145,3867	58,4333	36,5267	31,0967	60,2367	49,49	8,03333	27,4967	284,15	40,9425	67,22	21,83333	9,533	3,833333	
	SE	0,0238017	0,0026034	5,37742	5,81664	0,416333	0,088192	44,534	8,80371	7,01671	0,97694	8,22214	5,1761	1,68972	2,76433	61,3302	12,2514	8,51906	6,16775	2,70335	0,920682	
	CV	0,02317753	0,0002603	0,20292151	0,252897	0,271522	0,330718	0,306314	0,150663	0,192098	0,031416	0,136497	0,104589	0,210339	0,100533	0,215837	0,299234	0,126734	0,282492	0,283578	0,240178	

Figure 5: les résultats bruts