

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 Biologie des Populations et des Organismes



Mémoire de fin d'études

Pour l'obtention du diplôme de Master

Option : Biologie et Physiologie de la Reproduction

Thème

**Réalisation du spermogramme par la méthode
classique chez le chien**

Soutenu le 14 octobre 2020

Présenté par :

BOUZOUAD yacine

Devant le jury :

- | | | |
|---------------------------|----------------------|---------------------|
| - Dr. W. CHAICHI | MCA / UB1 | Présidente |
| - Dr. M. GUEDIOURA | MCB / Ub1 | Examineur |
| - Dr. M. DJOUDI | MCB / ISV-UB1 | Promoteur |
| - Dr. R. BELLALA | MCB / ISV-UB1 | Co-promoteur |

Résumé :

Cette étude s'intéresse à l'appareil reproducteur mâle du chien, nous avons élucidé toutes les structures et les processus qui interviennent à l'élaboration du spermatozoïde, cellule sexuelle mâle portant le patrimoine génétique. Nous avons également montré à quel point la science peut être impliquée dans la manipulation génétique à fin d'obtenir des résultats optimums, principalement grâce à la détection des anomalies qui peuvent siéger sur le spermatozoïde et par conséquent sur la qualité du sperme, menant à des cas d'infertilité. Une collecte de notions récentes concernant l'effet des oligo-éléments sur la fertilité a été faite, à fin de tirer des conclusions aidant à corriger les cas d'infertilité à travers des traitements médicamenteux ciblés.

La sous-fertilité représente un défi courant dans la reproduction canine et peut représenter une grave préoccupation sur le marché de l'élevage canin. A cet effet, une forte coopération entre tous les acteurs de la reproduction canine (vétérinaires, biologistes, zootechniciens, éleveurs et aussi industriels de l'agro-alimentaire) est recommandée afin de développer la reproduction chez le chien. Ainsi que, la standardisation des techniques d'évaluation de la semence canine peut nous aider à aboutir à des résultats scientifiques plus fiables.

En conclusion, il a été relevé que l'ensemble des articles récents ont prouvés que la supplémentation en vitamine E, zinc, l'acide folique, l'huile d'olive extra vierge, sélénium, tyrosine, L-carnitine, GnRH et les oméga 3 et 6 ont un effet bénéfique pour les caractéristiques spermatique et augmente la fertilité chez les chiens souffrent d'une sous fertilité et aussi pour les chiens qui sont fertiles et les rendent plus performant.

Abstract

This study is interested in the male reproductive system of dogs, we have elucidated all the structures and processes involved in the development of the spermatozoon, a male sex cell carrying the genetic heritage. We have also shown how science can be involved in genetic manipulation in order to obtain optimum results, mainly through the detection of abnormalities that can sit on the sperm and therefore on the quality of the sperm, leading to poor results. cases of infertility. A collection of recent notions concerning the effect of trace elements on fertility was made, in order to draw conclusions helping to correct cases of infertility through targeted drug treatments.

Subfertility is a common challenge in dog breeding and can be a serious concern in the dog breeding market. To this end, strong cooperation between all players in canine reproduction (veterinarians, biologists, zootechnicians, breeders and also food manufacturers) is recommended in order to develop reproduction in dogs. As well, the standardization of canine semen evaluation techniques can help us achieve more reliable scientific results.

In conclusion, it was noted that all recent articles have proven that supplementation with vitamin E, zinc, folic acid, extra virgin olive oil, selenium, tyrosine, L-carnitine, GnRH and Omega 3 and 6 have a beneficial effect on sperm characteristics and increases fertility in dogs suffering from subfertility and also for dogs which are fertile and make them more efficient.

نبذة مختصرة

تهتم هذه الدراسة بالجهاز التناسلي الذكري للكلب، فمنها من خلالها توضيح كل الهياكل و السلاسل الإنتاجية التي تنتهي بتركيب النطفة التي تمثل الخلية الجنسية الذكرية و التي تحمل الذاكرة الوراثية للحيوان اهتمت الدراسة أساسا على إبراز أهمية العلوم و مدى تغلغلها في التحكم الجيني من اجل الحصول على نتائج ممتازة، و هذا بواسطة البحث و تحديد التشوهات الخلقية التي قد تحدث على مستوى النطفة و بالتالي على جودة النطاف ، أصل كل مشكل في الخصوبة تم كذلك تجميع دراسات علمية حديثة تخص فعالية المكملات الغذائية على الخصوبة حتى نتمكن من استخلاص قواعد تجعلنا نعتمد على علاجات دوائية خاصة.

تهتم هذه الدراسة بالجهاز التناسلي الذكري عند الكلاب ، و قد أوضحنا جميع الهياكل و العمليات التي تدخل في تطوير الحيوانات المنوية ، خلية جنسية ذكرية تحمل المورثات الجينية. لقد أظهرنا أيضا كيف يمكن للعلم أن يشارك في التحكم الجيني من أجل الحصول على أفضل النتائج ، خاصة من خلال الكشف عن التشوهات التي قد تحدث على النطفة و بالتالي على جودة الحيوانات المنوية ، أصل كل مشكل في الخصوبة تم كذلك تجميع دراسات علمية حديثة تخص فعالية المكملات الغذائية على الخصوبة حتى نتمكن من استخلاص قواعد تجعلنا نعتمد على علاجات دوائية خاصة.

يعد ضعف الخصوبة تحديًا شائعًا في تربية الكلاب ويمكن أن يكون مصدر قلق كبير في سوق تربية الكلاب. تحقيقا لهذه الغاية ، يوصى بالتعاون القوي بين جميع المعنيين في مجال تكاثر الكلاب (الأطباء البيطريون وعلماء الأحياء و فنيو تربية الحيوانات و المربيون و كذلك مصنعو الأغذية) من أجل تطوير التكاثر عند الكلاب. بالإضافة إلى ذلك، فإن توحيد تقنيات تقييم السائل المنوي للكلاب يمكن أن يساعدنا في تحقيق نتائج علمية أكثر ثقة.

في الختام ، لوحظ أن جميع المقالات الحديثة قد أثبتت أن المكملات التي تحتوي على فيتامين E والزنك وحمض الفوليك و زيت الزيتون البكر الممتاز والسيلينيوم والتيروزين والكارنيتين و GnRH وأوميغا 3 و 6 لها تأثير مفيد على خصائص الحيوانات المنوية و يزيد من الخصوبة عند الكلاب التي تعاني من ضعف الخصوبة وكذلك الكلاب التي تكون خصبة تجعلها أكثر كفاءة.

Remerciements

*Je dédie ce travail qui n'aura jamais pu voir le jour sans les soutiens indéfectibles et sans limites de mes chers **parents** qui ne cessent jamais de me donner avec amour le nécessaire pour que je puisse arriver à ce que je suis aujourd'hui. Que **DIEU** vous protège et que la réussite soit toujours à ma portée pour que je puisse vous combler de bonheur.*

*Je tiens à remercier le **Dr. Djoudi** mon promoteur et le **Dr. BELLALA** co-promoteur pour leurs précieux conseils au cours des différentes étapes de ce projet.*

Nous adressons aussi nos remerciements :

Aux membres du jury qui ont accepté d'examiner notre travail.

A tous mes professeurs de la saison universitaire 2019/2020

*A Mes sœurs : **Malak, Wafaa** et **Soumaya**.*

A mes oncles.

*A tous mes chers amis qui m'ont toujours encouragé et soutenus tout le long de mon parcours universitaire et spécialement : **Oussama, Nadir, Karim, Abdel Kader, Rania , Arken, Assia, Houcine***

*A mes cousins et cousines surtout : **Amine** et **Housseem**.*

A tous mes amis de l'institut des sciences vétérinaires de Blida, et la faculté des sciences de la vie.

Enfin, un grand merci à toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Sommaire

Introduction :	8
Chapitre I : Anatomie et physiologie de la reproduction chez le chien.....	9
1. Anatomie de l'appareil génital mâle	10
1-1 Section glandulaire.....	10
1-2 Section tubulaire.....	10
1-3 Section urogénitale.....	11
2. Élaboration du sperme.....	11
2.1. La puberté.....	11
2.2. L'élaboration du sperme.....	11
2.3. Spermatogenèse.....	12
3. Le spermatozoïde canin.....	13
3.1. Définition	13
3.2. La tête du spermatozoïde.....	13
3-2.1 Le noyau.....	13
3-2.2 L'acrosome.....	14
3.3. Le flagelle.....	14
Chapitre II : l'infertilité chez le mâle :	15
1. La fertilité mâle	16
2. Étiologies et devenir des animaux infertiles.....	16
3. Les causes de l'infertilité chez le chien.....	17
3.1. Modifications testiculaires	17
3.2. Modifications péniennes	18
3.3. Modifications hormonales d'infertilité.....	18
3.4. Les causes alimentaires d'infertilité.....	19
3.5. Les baisses de libido.....	19
3.6. Les causes iatrogènes d'infertilité	20
4. Collection et évaluation de la qualité spermatique.....	20
4.1. Définition du sperme	20
4.2. Récolte de la semence	20
4.2.1. Méthode de prélèvement	20
4.2.2. Matériel nécessaire au prélèvement	21
4.2.3. Environnement idéal pour le prélèvement.....	21
4.2.4. Technique de prélèvement.....	22
4.2.5. Fréquence de prélèvement.....	22
4.3. Les types des semences	22

4.3.1.	Semence fraîche	23
4.3.2.	Semence réfrigérée	23
4.3.3.	Semence congelée	23
4.4.	Evaluation de la qualité de la semence.....	24
4.4.1.	Aspect normal de la semence canine.....	24
4.4.2.	La Couleur.....	25
4.4.3.	Le pH.....	25
4.4.4.	Le volume.....	25
4.4.5.	La Mobilité.....	25
4.4.6.	La morphologie	26
4.4.7.	La concentration :.....	27
4.4.8.	Coloration du mort-vivant	28
4.4.9.	Test de gonflement hypo-osmotique des spermatozoïdes (HOS)	28
4.4.10.	Coloration fluorescente	29
5.	Limites des techniques classiques d'examen de sperme	30
6.	Analyse du sperme assistée par ordinateur (Computer Assisted SpermAnalysis = CASA)	31
7.	Bilan sur l'évaluation de la qualité de la semence	33
	Chapitre III : Essai d'une méta-analyse	34
1.	OBJECTIF.....	35
2.	Matériel et méthode.....	35
3.	Présentation des Résultats	36
4.	Discussion	40
5.	Recommandations :	41
	Références bibliographiques	41

Liste des figures

- Figure n°1 : Schéma du testicule et de l'épididyme (Derivaux, 1986) ;
- Figure n°2 ; les étapes de la spermatogénèse ;
- Figure n° 3 ; structure schématique du spermatozoïde (Dadoune et al., 1990) ;
- Figure n°4 ; schéma d'une épididymite ;
- Figure n°5 : ectopie testiculaire chez le chien ;
- Figure n°6 : Récupération de semence chez le chien par masturbation manuelle au CERREC (Centre d'Etude et recherche en Reproduction et Elevage Canin) ;
- Figure 7 : Matériel utilisé au CERREC pour le prélèvement de semence ;
- Figure n°8 : *Les trois phases de l'éjaculat d'un chien* (Sagot, 2019) ;
- Figure n° 9: Coloration à l'éosine-nigrosine (England, 2012) ;
- Figure 10: Principales anomalies morphologiques majeures et mineures (Ott et al., 1987) ;
- Figure n°11 : Modifications morphologiques des spermatozoïdes soumis au test hypo-osmotique (Jeyendran et al., 1984) ;
- Figure n° 12 : le dispositif CASA Computer Assisted Sperm Analysis. (<https://www.indoreinfertilityclinic.com/male-infertility-test/casa-computerized-semen-analysis-test/>) ;
- Figure n° 13: image obtenue par le système CASA.

Liste des abréviations

- ADN : Acide Désoxyribo Nucléique
- PMA : Procréation Médicalement Assistée
- CERREC : Centre d'Etude et Recherche en Reproduction et Elevage Canin
- CASA : Computer Assisted Sperm Analysis

Introduction :

Depuis la nuit des temps, le chien a été connu comme l'ami Fidel de l'homme en prenant compte l'attachement réciproque qui se crée entre ces deux êtres, en effet l'amour du chien est inconditionnel et est illustré dans beaucoup de situations à savoir le domaine de la sécurité (terrorisme et gardiennage) et celui de la santé (dépistage et assistance) ainsi que pour le loisir. L'homme quant à lui à beaucoup investi en se basant sur la science sur cette espèce, il a apporté des améliorations génétiques du fait des croisements qui ont servi à augmenter les performances de l'animal.

Cette étude bibliographique a pour objectif d'éclaircir tout le savoir scientifique dévoilant les mystères de la fonction reproductive mâle et surtout de connaître comment caractériser la semence canine, la connaissance de ces notions scientifique est primordiale à fin de déceler les différentes anomalies de l'activité hormono-glandulaire menant à une modification qualitative et quantitative du spermatozoïde, pouvant être l'origine d'une éventuelle infertilité. Tout cela n'est possible que par l'établissement des différentes méthodes d'analyses et d'exploration de la semence canine. Notre étude s'intéresse également à un essai de méta-analyse portant sur l'effet des suppléments en oligo-éléments sur la qualité spermatique.

Enfin, l'étude allait se projeter sur un volet pratique concernant la réalisation d'une évaluation générale du sperme canin englobant toutes les opérations médico-expérimentales poussées au sein de la plateforme vétérinaire biotechnologique de la theriogenologie canine à l'Université de Blida. Cela n'était malheureusement pas possible en dépit des mesures préventives en relation avec la pandémie du coronavirus (COVID-19).

Chapitre I : Anatomie et physiologie de la reproduction chez le chien

1. Anatomie de l'appareil génital mâle

L'anatomie génitale du mâle dans sa complexité se doit de remplir trois fonctions, à savoir :

- produire les spermatozoïdes ;
- élaborer le sperme ;
- et enfin de déposer celui-ci dans les voies génitales femelles (Delompre, 2011).

Pour cela, on divise classiquement l'anatomie des organes génitaux mâles en trois sections :

1-1 Section glandulaire

La section glandulaire est formée par les **testicules**, organes globuleux responsables de la production des gamètes, les spermatozoïdes, et d'hormones stéroïdes comprenant principalement la testostérone.

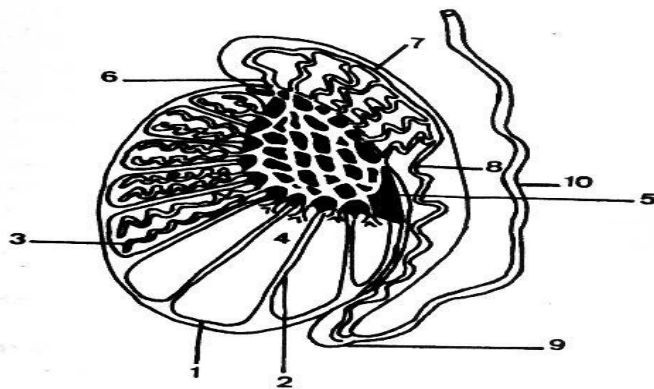
Les testicules, au nombre de deux, sont logés dans le scrotum en région périnéale basse. Leur taille varie en fonction du format du chien (Delompre, 2011).

Chaque testicule est entouré par l'albuginée qui se prolonge vers le centre du testicule en cloisons interlobulaires. Chaque lobule testiculaire se constitue de tubes séminifères qui se poursuivent jusqu'à l'épididyme.

1-2 Section tubulaire

Cette section est formée par les **épididymes** et **canaux déférents** dans lesquels va pouvoir s'effectuer la maturation des gamètes.

Les épididymes coiffent les testicules et se composent chacune d'une tête, un corps et une queue. Elles débouchent sur les canaux déférents, pris dans les cordons spermatiques. Ces cordons se composent en plus des canaux déférents, des artères et veines épididymaires et testiculaires.



1. Albuginée
2. Septum testis
3. Tubes séminifères
4. Tube droit
5. Rete testis
6. Cônes efférents
7. Tête de l'épididyme
8. Corps de l'épididyme
9. Queue de l'épididyme
10. Canal déférent.

Figure n°1: Schéma du testicule et de l'épididyme (Derivaux, 1986)

1-3 Section urogénitale

La section urogénitale est formée par **les glandes annexes** et **le pénis**. Les glandes annexes contribuent de façon non négligeable à l'élaboration du sperme. Parmi celles-ci on compte la **prostate**, glande bilobée ayant le rôle le plus important, c'est à son niveau qu'arrivent les canaux déférents. Elle se trouve accolée à l'urètre. Les **glandes de litté**, situées le long de l'urètre pénien. Et enfin les **glandes préputiales**, à la base du gland (Delompre, 2011).

Le **pénis**, organe permettant le dépôt du sperme dans les voies génitales femelle. Il comporte l'urètre pénien et un tissu musculaire intervenant dans les mécanismes de l'érection : le corps caverneux, partiellement ossifié chez le chien (Delompre, 2011).

2. Élaboration du sperme

2.1. La puberté

Les chiens sont, selon les races, pubères entre 7 et 18 mois ; les chiens de petite taille étant généralement pubères plus précocement que ceux de grande taille.

2.2. L'élaboration du sperme

L'élaboration du sperme s'effectue en plusieurs phases : tout d'abord la spermatogenèse à l'issue de laquelle sont produits les spermatozoïdes puis la phase de maturation des spermatozoïdes et enfin les sécrétions des glandes accessoires qui s'y ajoutent.

2.3. Spermatogénèse

La spermatogénèse a lieu dans les testicules de la puberté jusqu'à la fin de vie de l'animal, par vagues régulières. L'andropause n'existe donc pas dans l'espèce canine bien qu'il existe un certain nombre de facteurs pouvant influencer sur la spermatogénèse (Delompre, 2011). Elle s'effectue en plusieurs étapes :

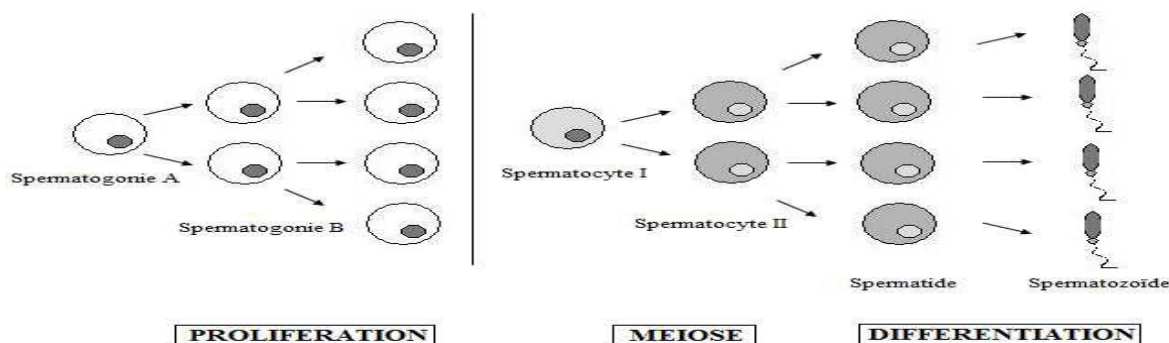


Figure n°2: les étapes de la spermatogénèse

- Dès la vie fœtale, les cellules souches appelées gonocytes vont donner des *spermatogonies*. Ces dernières constituent le pool de cellules germinales ;
- A partir de la puberté ces spermatogonies, appelée spermatogonies A, vont se multiplier à de nombreuses reprises, de ces mitoses certaines cellules vont rester des spermatogonies A afin de conserver un pool de cellules constant et les autres vont donner des *spermatogonies B* qui vont subir une différenciation allant aboutir à la formation de spermatozoïdes. Cette phase est appelée **phase de prolifération** ;
- La division des spermatogonies B va aboutir à la formation d'un nombre important de *spermatocytes*. Celles-ci vont ensuite subir la méiose en deux étapes, division réductionnelle (passage de cellules à 2n chromosomes à cellules à n chromosomes) puis division équationnelle (passage de cellules diploïdes à des cellules haploïdes), et ainsi donner des *spermatides*. On parle donc de **phase de méiose** ;
- Les spermatides vont évoluer en *spermatozoïdes* à l'issue de plusieurs remaniements structurels tels que la réorganisation du noyau, le développement de l'acrosome et l'assemblage des structures de la queue. C'est la **phase de différenciation** ;
- La spermatogénèse se termine par la **phase de spermiation** qui correspond à la libération des spermatozoïdes dans le tube séminifère (Delompré, 2011).

3. Le spermatozoïde canin

3.1. Définition

Le spermatozoïde est le gamète mâle. C'est une cellule haploïde hautement spécialisée en termes de fonction et de structure. Sa structure s'est spécialisée pour faciliter le passage dans les voies génitales mâles et femelles et protéger le matériel génétique qu'il contient. Ainsi, la tête et l'organe de mouvement du spermatozoïde, le flagelle, sont dotés de particularités morphologiques uniques à leur type cellulaire (Sagot, 2019)

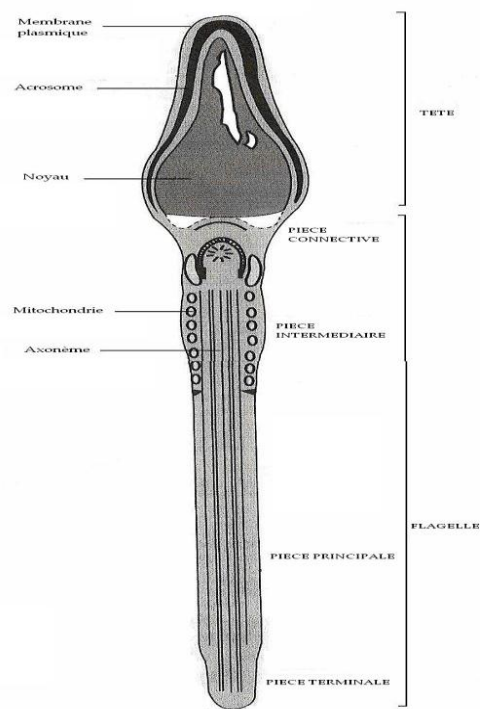


Figure n° 3 : *structure schématique du spermatozoïde* (Dadoune et al., 1990) (Sagot, 2019)

3.2. 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 ; Sagot, 2019). **Le noyau**

A la différence des cellules somatiques, le noyau du spermatozoïde est moins volumineux et la chromatine qu'il renferme est bien plus concentrée. En effet, le noyau ne contient que la moitié du matériel génétique présent dans une cellule somatique diploïde. Ensuite, les histones, protéines enroulant autour d'elles la chromatine dans les noyaux des cellules somatiques, sont remplacées par un autre type de protéine : la protamine. Cette protéine basique est substituée aux histones en fin de spermiogénèse. Elle se lie fortement aux bases nucléiques acides, condensant ainsi de manière bien plus importante la chromatine. Toute transcription d'ADN est alors impossible (Sagot, 2019).

3-2.2 L'acrosome

L'acrosome se forme à partir d'une extension de l'appareil de golgi à la fin de la spermatogenèse.

Cet organite est essentiel au bon déroulement des étapes de la fécondation.

Il contient des protéines et enzymes ayant plusieurs rôles : l'attachement et la pénétration du spermatozoïde à travers la zone pellucide entourant l'ovocyte, la fusion des membranes des deux gamètes et le relargage de substances empêchant la polyspermie par l'ovocyte après fécondation (Sagot, 2019).

3.3. 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 (Knobil and D. ; 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 (Sagot, 2019).

Chapitre II : l'infertilité chez le mâle :

1. La fertilité mâle

Un individu est dit fertile dès lors qu'il est apte à la procréation. En médecine humaine, l'infertilité d'un couple se définit comme « l'incapacité à concevoir après 12 mois au moins de rapports sexuels non protégés ». Ainsi, les valeurs de référence pour le sperme humain ont été calculées chez un échantillon d'hommes considérés comme fertiles car ayant pu concevoir dans un délai inférieur à 12 mois (Cooper et al., 2009 ; Delompré, 2011).

La notion de fertilité mâle au sens plus large que cette définition c'est-à-dire ne tenant pas uniquement compte de la production en qualité et en quantité suffisante de gamètes nous semble plus cohérente. En effet, il faut tenir compte aussi de l'anatomie des organes génitaux, du fonctionnement des glandes annexes et de la libido. Cet ensemble jouant un rôle primordial au bon déroulement de la reproduction du mâle. Ceci conduit à caractériser cet ensemble dans ses particularités physiologiques (Delompré, 2011).

2. Étiologies et devenir des animaux infertiles

Plusieurs causes d'infertilité peuvent être mises en cause (Fontbonne, 1999 ; Laing et al., 1988 ; Menezo et Cohen, 2009), à savoir :

- Les **causes anatomiques**, qui peuvent être congénitales ou acquises. Pour certaines d'entre elles l'avenir reproducteur du chien est irréversiblement compromis, pour d'autres une intervention, chirurgicale la plupart du temps, peut permettre à l'animal de reproduire. Enfin dans certains cas les méthodes de PMA peuvent être envisagées ;
- Les **causes physiopathologiques** concernent quant à elles les états inflammatoires (d'origines traumatiques, dysimmunitaires, infectieuses...), les endocrinopathies et les processus néoplasiques ;
- Les **anomalies génétiques** peuvent correspondre soit à un caryotype soit à un gène anormal, dans ce dernier cas on distinguera selon les pathologies en découlant des races et lignées prédisposées ;
- Les **causes comportementales** ont toutes une influence sur la libido de l'animal ;
- Enfin les **causes environnementales** toutes les toxiques et les conditions défavorables qui peuvent altérée la fertilité (Delompré, 2011).

3. Les causes de l'infertilité chez le chien

3.1. Modifications testiculaires

Parmi les anomalies congénitales on peut trouver *l'ectopie testiculaire ou cryptorchidie*, qui se traduit par une absence de descente d'un ou des deux testicules dans les bourses. Cette anomalie a une incidence de 2% dans la population canine. Les chiens ayant cette affection sont infertiles que lorsque l'atteinte est bilatérale, en effet, bien que la stéroïdogénèse se déroule normalement, la gamétogénèse est, elle, altérée en raison de la température intra testiculaire (que le testicule se trouve en position inguinale ou abdominale) inadéquate à son bon déroulement (Delompré, 2011).

L'*épididymite* se traduit par une inflammation de l'épididyme, dans la plupart des cas elle est due à une infection bactérienne. Elle s'associe souvent d'une *orchite*. On parle alors d'*orchiépididymite*.

L'infection arrive la plupart du temps par voie hématogène mais peut aussi résulter d'une pénétration via un traumatisme sur le scrotum (Delompré, 2011).

Epididymite

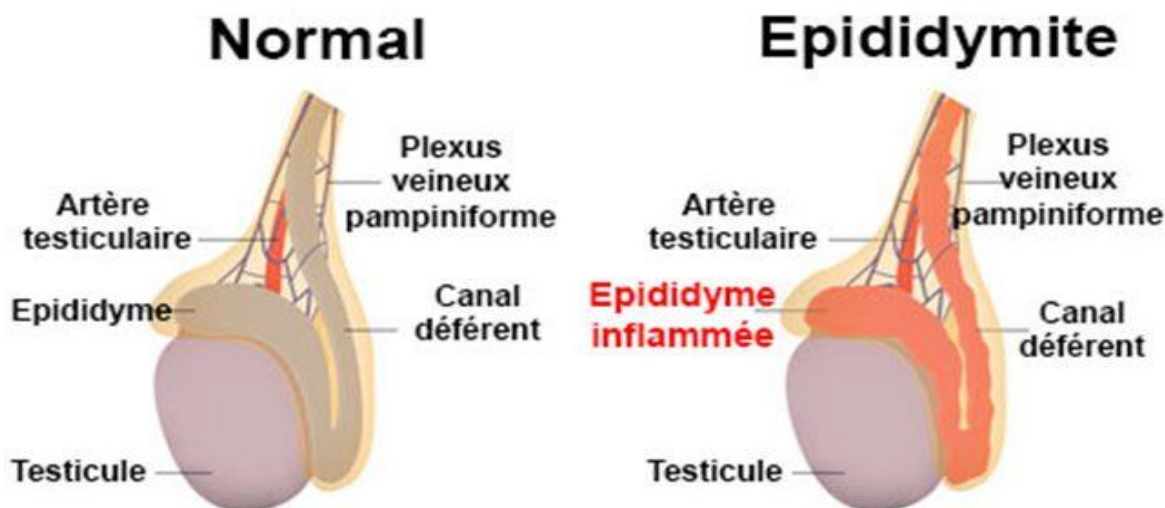


Figure n°4 : schéma d'une épididymite.
(<https://www.docteurcliv.com/maladie/epididymite.aspx>)

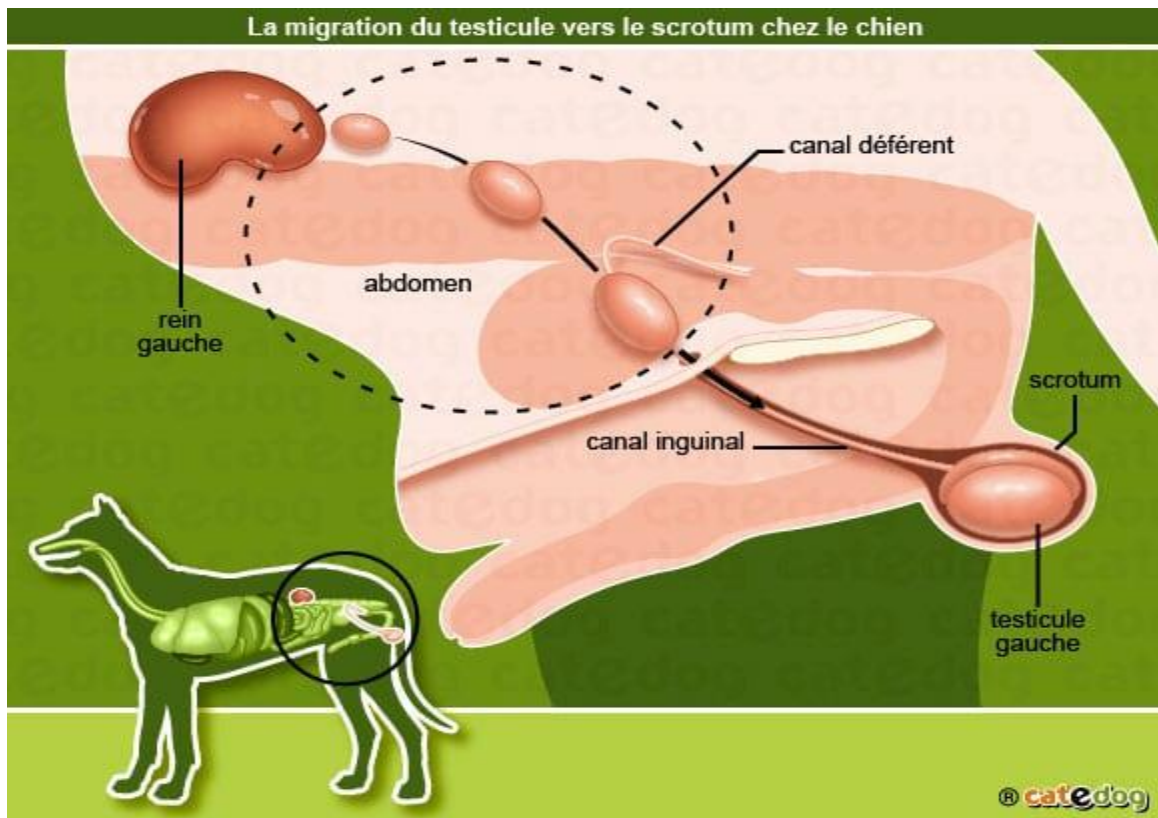


Figure n°5 : ectopie testiculaire chez le chien.

3.2. Modifications péniennes

L'*hypospadias* est une des anomalies de l'urètre les plus fréquentes chez le chien. Elle se traduit par un abouchement de l'urètre en face inférieure du pénis. Ainsi bien que la qualité du sperme et la libido soient normales, l'animal n'est pas en mesure de déposer sa semence correctement dans les voies génitales femelles. L'*épispadias* quant à lui est très rare et entraîne pour les mêmes raisons une infertilité (Delompré, 2011).

3.3. Modifications hormonales d'infertilité

Les *tumeurs sécrétant des oestrogènes* (entraînant un syndrome de féminisation, on citera pour exemple le sertolinome) ainsi que les *tumeurs touchant le cerveau* susceptibles d'entraîner une baisse de libido. Une baisse du taux de testostérone sanguin serait souvent mise en cause en relation avec la présence de ses tumeurs. Lors de sertolinome la castration est indispensable (Delompré, 2011).

L'*hypothyroïdie* est une cause bien connue d'infertilité, elle ne se manifeste pas forcément par des signes cliniques évidents et peut donc être une découverte lors d'une consultation pour motif d'infertilité (Delompré, 2011).

3.4. Les causes alimentaires d'infertilité

Un *déséquilibre alimentaire* peut agir sur la fertilité de l'animal, en voici les facteurs les plus fréquemment évoqués :

- Une alimentation trop pauvre, notamment en protéine va entraîner des dysfonctionnements métaboliques à l'origine d'une baisse de la spermatogenèse (Delompré, 2011) ;
- Un déficit en folates (ou vitamines B12) qui interviennent dans la régulation de l'expression des gènes et jouent donc un rôle dans la maturation des spermatozoïdes. Il a été montré une corrélation entre une baisse du nombre de spermatozoïdes par éjaculat et une carence en folates ainsi qu'un lien entre anomalies chromosomiques des spermatozoïdes et carence en folates (notamment dans les cas de trisomie 21 chez l'Homme). On comprend donc qu'une supplémentation en folates est parfois proposée lors d'oligospermie (Forges et al., 2008) ;
- Les vitamines A, E et C font l'objet de nombreuses études contradictoires, certaines indiquant qu'une carence en ces vitamines peut être directement à l'origine d'infertilité, d'autres expliquant que de telles carences entraînent une série de dysfonctionnements organiques pouvant par la suite influencer sur la fonction de reproduction. Dans tous les cas il a été démontré qu'un important stress oxydatif avait pour conséquence de diminuer de façon importante les divisions cellulaires au sein du testicule et donc la spermatogenèse (Delompré, 2011) ;
- Un déficit en sélénium serait à l'origine d'une augmentation significative de spermatozoïdes anormaux (morphologie et motilité), en revanche il n'y aurait aucune incidence sur le volume et le nombre de spermatozoïdes dans les éjaculats (Delompré, 2011) ;
- Un déficit en zinc entraînerait par ailleurs une baisse du taux sérique de testostérone ainsi qu'une baisse du volume des éjaculats et de la qualité des spermatozoïdes produits (Colagar et al., 2009 ; Delompré, 2011) ;

3.5. Les baisses de libido

On peut évoquer pour origines de manque de libido: des désordres hormonaux, une pathologie algique, certaines substances médicamenteuses, une atteinte de l'état général, une prédisposition raciale et enfin une origine psychique (Delompré, 2011).

Parmi les *origines psychiques*, *l'âge* de l'animal. C'est un facteur à ne pas négliger, en effet un animal jeune peut malgré qu'il soit pubère être immature sexuellement parlant et à l'inverse un

animal âgé ayant été utilisé pour de nombreux accouplements peut présenter une baisse de libido **la présence d'humains** dans la pièce au moment de la saillie peut inhiber l'expression du comportement du chien (Fontbonne, 1996 ; Delompré, 2011).

3.6. Les causes iatrogènes d'infertilité

Les **causes iatrogènes** à l'infertilité sont à ne pas à minimiser. Selon le type de thérapie, le temps et la dose d'exposition, les effets sur la fertilité du mâle seront plus ou moins longs. En revanche ces effets sont généralement réversibles. La plupart du temps l'action se porte sur la qualité du sperme ou la production des hormones stéroïdes.

En voici une liste non exhaustive :

- Anti-infectieux : amphotéricine B, diméridazole, hexachlorophène, sulfamides, niridazole ;
- Anticancéreux : chlorambucil, cyclophosphamide, glucocorticoïdes, vinblastine, colchicine, corticoïdes ;
- Hormones : stéroïdes anabolisants, anti-androgènes, diethylstilbestrol, oestrogènes, Testostérone, progestérone et progestatifs de synthèse ;
- Antiulcéreux : cimétidine ;
- Neuroleptiques : acépromazine, métopropramide, chlorpromazine ;
- Diurétiques : spironolactones (Delompré, 2011).

4. Collection et évaluation de la qualité spermatique

4.1. Définition du sperme

Le sperme est un liquide biologique animal complexe expulsé du corps (mâle) lors de l'éjaculation. Il varie d'une espèce à une autre et dans la même espèce sa mobilité est différente d'un individu à un autre, avec un volume qui varie selon les espèces, et même dans l'espèce. Dans ce dernier cas, il sera en rapport avec l'état physiologique du mâle, l'individu, la race, le développement corporel, le nombre de saillies ou de récolte et la méthode de récolte ainsi la saison (Leboeuf et *al.*, 2003).

4.2. Récolte de la semence

4.2.1. Méthode de prélèvement

La méthode de choix pour la récolte de la semence est le prélèvement manuel, en présence d'une chienne en chaleurs.

La récolte par électroéjaculation, utilisée surtout chez le chat, est possible mais s'avère rarement nécessaire et peut parfois entraîner une contamination de la semence par de l'urine (Vivin, 2019).



Figure n°6 : *Récupération de semence chez le chien par masturbation manuelle au CERREC*

4.2.2. Matériel nécessaire au prélèvement

Le prélèvement requiert peu de matériel :

- un cône souple en silicone, de taille adaptée à la taille du chien ;
- un tube de centrifugation stérile (Vivin, 2019).

Il est important que le matériel en contact avec la semence ait été abondamment rincé à l'eau après nettoyage puis laissé sécher à l'air libre afin de limiter toute altération de la semence (Vivin, 2019).



Figure 7 : Matériel utilisé au CERREC pour le prélèvement de semence (Vivin, 2019)

4.2.3. Environnement idéal pour le prélèvement

La récolte doit se dérouler dans un lieu calme, en présence ou non du propriétaire selon le comportement du chien. Le sol ne doit pas être glissant.

Il est tout à fait possible d'obtenir de la semence en l'absence d'une chienne dans la pièce, mais cela peut s'avérer nécessaire si le mâle à prélever est anxieux ou s'il présente peu ou pas de

libido. De plus, la présence d'une chienne, surtout si elle est en chaleurs, améliore la qualité de la semence prélevée.

A défaut de la présence d'une chienne, un écouvillon vaginal réalisé chez une chienne en chaleurs peut être conservé congelé, puis décongelé et présenté au mâle avant et pendant le prélèvement (Vivin, 2019).

4.2.4. Technique de prélèvement

Idéalement, trois (03) personnes sont présentes : une personne tient la chienne en chaleur, une autre tient le mâle et la dernière personne s'occupe de la récolte.

Le mâle est présenté au niveau de l'arrière-train de la femelle. Une stimulation manuelle vigoureuse des bulbes érectiles est réalisée jusqu'à l'érection, puis le pénis est extériorisé.

Le cône de prélèvement est alors rapidement mis en place avant l'éjaculation. Le pénis peut être retourné en arrière afin de reproduire au maximum les conditions naturelles d'une saillie (Fontbonne et al., 2007 ; Johnston et al., 2001 ; Vivin, 2019).

Il est important de maintenir une striction en arrière des bulbes érectiles durant toute la durée de l'éjaculation pour maintenir une érection (Johnston et al., 2001 ; Vivin, 2019).

A la fin du prélèvement, il convient de ne pas oublier de replacer le pénis dans le fourreau afin d'éviter toute striction de l'extrémité distale du pénis, pouvant conduire à un oedème et une nécrose ischémique (Johnston et al., 2001 ; Vivin, 2019)

4.2.5. Fréquence de prélèvement

Une fréquence de prélèvement supérieure à 1 fois tous les 2 jours entraînerait une diminution du nombre de spermatozoïdes mobiles par éjaculat. Les auteurs ont donc conclu que la fréquence maximale de prélèvement n'entraînant pas de modification de la qualité de la semence était d'une fois tous les 2 jours (Vivin, 2019).

Il semblerait qu'une période de repos trop longue entre deux (02) éjaculations entraîne une diminution de la mobilité des spermatozoïdes et une augmentation du pourcentage de spermatozoïdes anormaux (Vivin, 2019).

4.3. Les types des semences

Il existe trois types de semences qui servent généralement pour l'évaluation soit pour les études expérimentales soit pour l'insémination artificielle.

4.3.1. Semence fraîche

Une semence fraîche est une semence qui vient d'être récoltée, qui n'a pas subi de modifications thermiques et qui n'a reçu aucun additif. Le prélèvement du mâle est directement suivi de l'insémination de la femelle.

La réfrigération et la congélation de la semence entraînent systématiquement une altération de celle-ci ; l'insémination en semence fraîche est donc à privilégier afin de maximiser les chances de gestation. Cependant, elle nécessite la présence du mâle au moment où l'insémination est décidée, ce qui n'est pas toujours réalisable en pratique (Vivin, 2019).

4.3.2. Semence réfrigérée

Une semence réfrigérée est une semence à laquelle a été rajouté un dilueur, permettant sa conservation plusieurs jours à +4°C : 2 à 5 jours en pratique, et jusqu'à 11 jours pour une semence d'excellente qualité au moment du prélèvement et dans des conditions optimales de conservation (Vivin, 2019).

L'avantage de l'utilisation de semence réfrigérée est de permettre la reproduction d'un chien et d'une chienne éloignés géographiquement, à un coût abordable et avec moins d'altérations que si l'on utilisait de la semence congelée.

Peu de matériel est nécessaire pour réfrigérer de la semence : une centrifugeuse pour récupérer la fraction spermatique, un réfrigérateur pouvant refroidir à +4°C, un dilueur réfrigéré, des tubes, et une bouteille thermos pour le transport éventuel. (Vivin, 2019)

4.3.3. Semence congelée

Une semence congelée est une semence à laquelle a été rajouté un dilueur, lui permettant d'être conservée indéfiniment dans de l'azote liquide à -196°C.

L'intérêt de la semence congelée est que celle-ci peut être utilisée de nombreuses années après sa collecte. On procède à la congélation de semence pour préserver la semence d'un étalon de grande valeur, en prévention d'un accident ou d'un décès par exemple. De plus, la congélation est nécessaire lorsque l'on prévoit de faire reproduire 2 individus trop éloignés géographiquement pour envisager un envoi de semence réfrigérée.

Par contre, la congélation étant à l'origine d'importantes altérations, celle-ci doit être envisagée pour des semences d'excellente qualité au départ (Vivin, 2019).

Le dilueur pour semence congelée contient globalement les mêmes éléments que le dilueur pour semence réfrigérée, mais du glycérol est ajouté en plus du jaune d'œuf pour son effet cryoprotecteur plus important (cryoprotecteur intracellulaire) (Vivin, 2019).

4.4. Evaluation de la qualité de la semence

4.4.1. Aspect normal de la semence canine

La semence du chien est composée de 3 fractions :

- la fraction pré-spermatique, d'origine prostatique. De couleur claire, elle est peu volumineuse (entre 0,5 et 5 ml) et contient peu ou pas de spermatozoïdes ;
- la fraction spermatique, d'origine épидidymaire. De faible volume également (entre 1 et 4ml), elle est généralement d'aspect laiteux car riche en spermatozoïdes. Une fraction spermatique de couleur claire ou translucide doit donc alerter l'inséminateur car cela témoigne d'une faible concentration en spermatozoïdes. Il convient de toujours effectuer un comptage au microscope car la fraction spermatique peut présenter une couleur normale et pourtant être peu concentrée ;
- la fraction prostatique, de volume beaucoup plus important allant de 1 à 80 ml, de couleur claire et contenant peu ou pas de spermatozoïdes (Vivin, 2019)

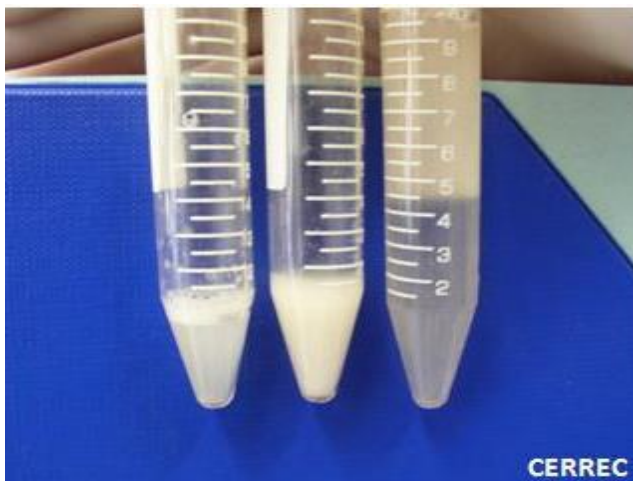


Figure n°8 : Les trois phases de l'éjaculat d'un chien (Sagot, 2019)

Au final, le volume normal d'une semence canine varie entre 2,5 et 80 ml environ. Le volume étant en grande partie déterminé par la troisième fraction ou fraction prostatique, il ne constitue donc pas un indicateur de bonne qualité de la semence (Vivin, 2019).

Trois caractéristiques apparaissent essentielles dans l'évaluation de la qualité de la semence : la mobilité, la morphologie et le nombre de spermatozoïdes (Vivin, 2019).

4.4.2. La Couleur

Un échantillon de sperme clair ne contient aucun spermatozoïde. Les échantillons nuageux ou laiteux contiennent probablement des spermatozoïdes, mais doivent toujours être vérifiés au microscope pour confirmation. Occasionnellement, un chien avec azoospermie répandra un nombre excessif de gouttelettes de graisse dans l'échantillon qui donne l'apparence de sperme normal. La couleur jaune peut indiquer la contamination de l'urine. La couleur verte indique la présence de pus. La couleur rouge ou brune indique un sang frais ou hémolysé dans le sperme (Johnston et al., 2001). Les causes les plus courantes pour le sang dans le sperme comprennent la maladie prostatique ou des dommages aux vaisseaux sanguins sur le pénis. La présence de sang dans le sperme n'a aucun effet sur la motilité des spermatozoïdes avant six heures de contact (England et Allen, 1992). L'hémispermie indique une maladie prostatique et un traumatisme du pénis chez les chiens (Arokia et al., 2016).

4.4.3. Le pH

Le plasma séminal du chien a un pH normal variant de 6,3 à 7,0 (Threlfall, 2003) a recommandé que l'évaluation du pH soit effectuée immédiatement après le prélèvement à l'aide d'un équipement précis (probablement un pH-mètre) et a fortement déconseillé l'utilisation d'une méthode de « jauge graduée ». Le liquide prostatique a une plage normale de 6,0 à 7,4 avec une moyenne de 6,5 ou 6,8. (Feldman et Nelson, 1996 ; Johnston, 1989). Le pH est utile pour la sélection des antibiotiques en cas d'infection (Arokia et al., 2016).

4.4.4. Le volume

Le volume de sperme n'est pas un indicateur de la qualité du sperme chez les chiens. Toutefois, le volume doit être mesuré dans la partie du calcul du nombre total de spermatozoïdes dans l'échantillon. Le volume de la première et de la troisième fraction en particulier sont variables et le volume est contrôlé par la personne prélevant l'échantillon (Arokia et al., 2016).

4.4.5. La Mobilité

La motilité est une manifestation de la compétence structurelle et fonctionnelle des spermatozoïdes; ainsi, le pourcentage de spermatozoïdes progressivement motiles est habituellement positivement corrélé à celui de l'intégrité de la membrane plasmique (Kumi-Diaka, 1993; Rodriguez-Gil et al., 1994) et de morphologie normale (Ellington et al., 1993). La motilité des spermatozoïdes doit être évaluée immédiatement après le prélèvement. Si l'échantillon est trop concentré pour évaluer la motilité, une goutte de sperme peut être diluée avec une goutte de solution saline tamponnée au pH approprié (Johnston, 1989). Des

renseignements récents indiquent qu'une lame réchauffée n'est peut-être pas nécessaire parce que le sperme canin est résistant au choc froid, au moins au-dessus de 70 °F (Johnston et al., 2001). La motilité normale est décrite comme un mouvement rapide, progressif et en avant. Le pourcentage de spermatozoïdes motiles totaux dans les éjaculats canins normaux se situe entre 70 et 90 % (Johnston et al., 2001; Iguer-Ouada et Verstegen, 2001). Bien que, il peut être plus faible après des périodes prolongées de repos sexuel. On a proposé que les chiens fertiles aient au moins 70 % de la motilité totale des spermatozoïdes (Larsen, 1980). On peut également évaluer la vitesse ou la qualité de la motilité; un spermatozoïde canin ayant une motilité normale devrait traverser le champ de vision microscopique en 2 à 3 secondes (Threlfall, 2003 ; Arokia et al, 2016).

4.4.6. La morphologie

L'examen morphologique des spermatozoïdes est réalisé idéalement à l'aide d'un microscope à contraste de phase, afin d'éviter toute altération due à une éventuelle coloration. Tous les laboratoires n'étant pas équipés de ce type de microscope, l'évaluation peut néanmoins être faite au microscope classique après coloration à l'éosine-nigrosine ou de type May-Grünwald Giemsa, mais l'interprétation sera plus délicate (Vivin, 2019).



Figure n° 9: Coloration à l'éosine-nigrosine (England, 2012 ; Christine et al., 2017)

Les anomalies morphologiques des spermatozoïdes peuvent être classées selon :

- la partie anatomique où se situe l'anomalie ;
- leur caractère primaire (développement de l'anomalie pendant la spermatogénèse) ou secondaire (développement au cours du stockage dans l'épididyme ou lors de la coloration après prélèvement par exemple) ;
- leur caractère mineur ou majeur, selon que les anomalies génèrent un trouble de la fertilité ou non (Vivin, 2019).

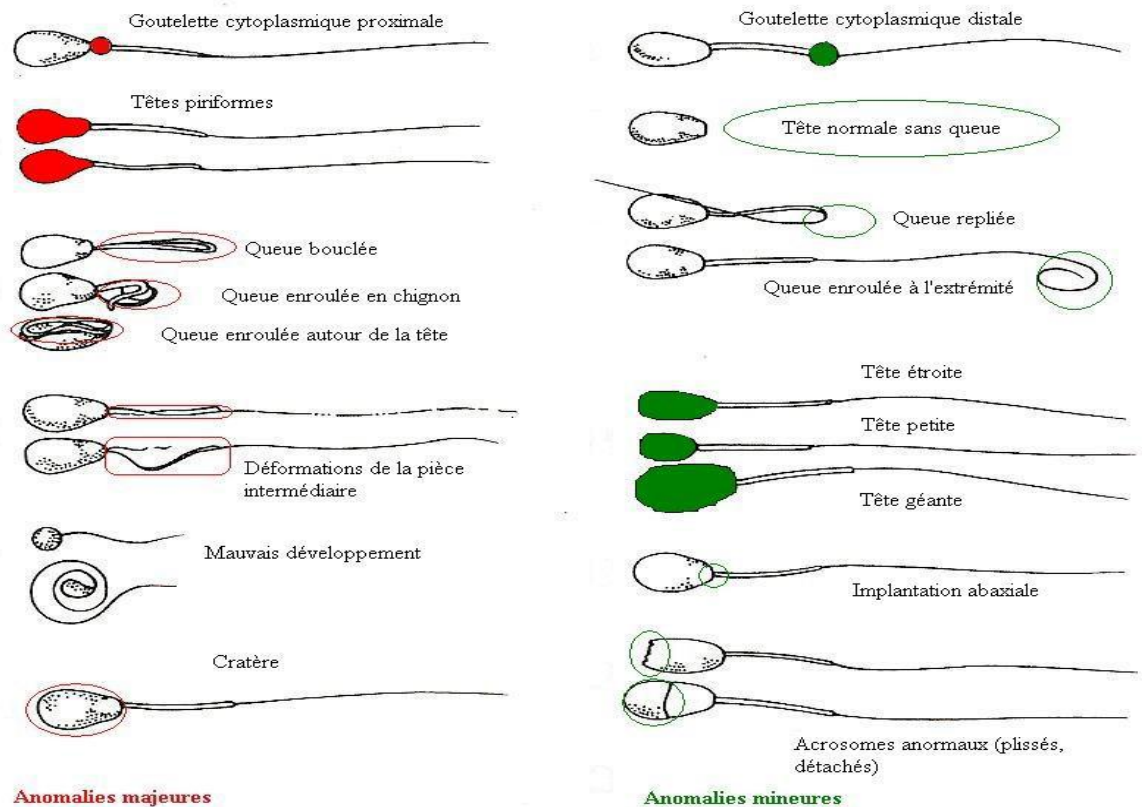


Figure 10: Principales anomalies morphologiques majeures et mineures (Ott et al., 1987 ; Christine et al., 2017)

4.4.7. La concentration :

La concentration de spermatozoïdes a peu de valeur comme indicateur de la qualité du sperme. Le nombre total normal de spermatozoïdes dans le sperme de chien est supérieur à 300 - 2000 millions (Johnston, 1992). La concentration est inversement liée au volume de sperme recueilli. Le nombre total de spermatozoïdes dépend de la taille des testicules (Olaretal, 1983) et il peut diminuer avec la collecte fréquente de sperme, probablement à mesure que les réserves d'épididymes s'épuisent (Angleterre, 1999). Les chiens normaux peuvent éjaculer des échantillons oligozoospermiques ou azoospermiques en raison de l'anxiété ou de la douleur (Martinez, 2004). La technique traditionnelle d'évaluation de la concentration des spermatozoïdes a été réalisée à l'aide d'un hémocytomètre. La technique de l'hémacytomètre a été rapportée comme étant tout aussi précise ou plus précise que les systèmes CASA et considérée comme l'étalon-or. Le spermocrite est la détermination de la concentration par évaluation du pourcentage de solides lorsque le sperme est centrifugé dans un tube hématocrite; cette technique n'est pas exacte chez les chiens (RootKustritz et al., 2006 ; Arokia et al., 2016).

4.4.8. Coloration du mort-vivant

L'éosine-nigrosine est l'une des meilleures méthodes pour déterminer le pourcentage de spermatozoïdes morts vivants dans un échantillon donné qui est le plus utilisé chez toutes les espèces domestiques. Il est simple, rapide et ne nécessite pas de manipulation cellulaire afin de déterminer les proportions de spermatozoïdes normaux et anormaux, vivants et morts. Les spermatozoïdes vivants avec acrosomes intacts semblent être blancs sur le fond sombre de la nigrosine présentant une crête apicale régulière et bien définie. Un bon échantillon de sperme canin devrait contenir au moins 80 % de spermatozoïdes morphologiquement normaux et viables (Johnston et al., 2001). Lorsque la proportion de spermatozoïdes normaux était inférieure à 60 pour cent, la fertilité a été affectée négativement (Oettlé, 1993). Les problèmes liés à ce test comprennent l'incapacité de classer les spermatozoïdes avec coloration partielle et interférence avec coloration si du glycérol ou des globules gras sont présents dans le liquide séminal (Rijsselaere et al., 2005 ; Arokia et al., 2016)

4.4.9. Test de gonflement hypo-osmotique des spermatozoïdes (HOS)

Le test HOS consiste à immerger les spermatozoïdes dans un milieu hypo-osmotique. Les spermatozoïdes dont les membranes plasmiques sont intactes gonflent à mesure que le liquide pénètre dans les spermatozoïdes, ce qui cause un gonflement et un enroulement de la queue (Martinez, 2004). Les solutions hypo-osmolaires décrites comprennent le citrate de sodium (7,35 g) et le fructose (13,51 g) dans 1 000 mL d'eau distillée et la solution de saccharose de 100 mM (Inamassu et al., 1999; Pinto et al., 2005). Dans une étude, le pourcentage maximal de spermatozoïdes enflés a été observé après 45 à 60 minutes d'incubation à 37,8 °C dans la solution hypo-osmotique. Dans une autre étude, le pourcentage de spermatozoïdes enflés n'était pas différent entre les échantillons incubés pendant <1 min et ceux incubés pendant 60 min (Rodriguez-Gil et al., 1994; Pinto et al., 2005). N'oubliez pas d'évaluer le pourcentage de spermatozoïdes à queue enroulée avant d'effectuer le test HOS; la valeur initiale doit être soustraite du pourcentage de spermatozoïdes avec des queues enroulées après incubation pour obtenir le pourcentage réel de spermatozoïdes avec des membranes plasmiques présumées intactes, tel que déterminé par cet essai (England et Plummer, 1993 ; Kurni-Diaka et Badtram, 1994 ; Inamassu et al., 1999 ; Arokia et al, 2016)

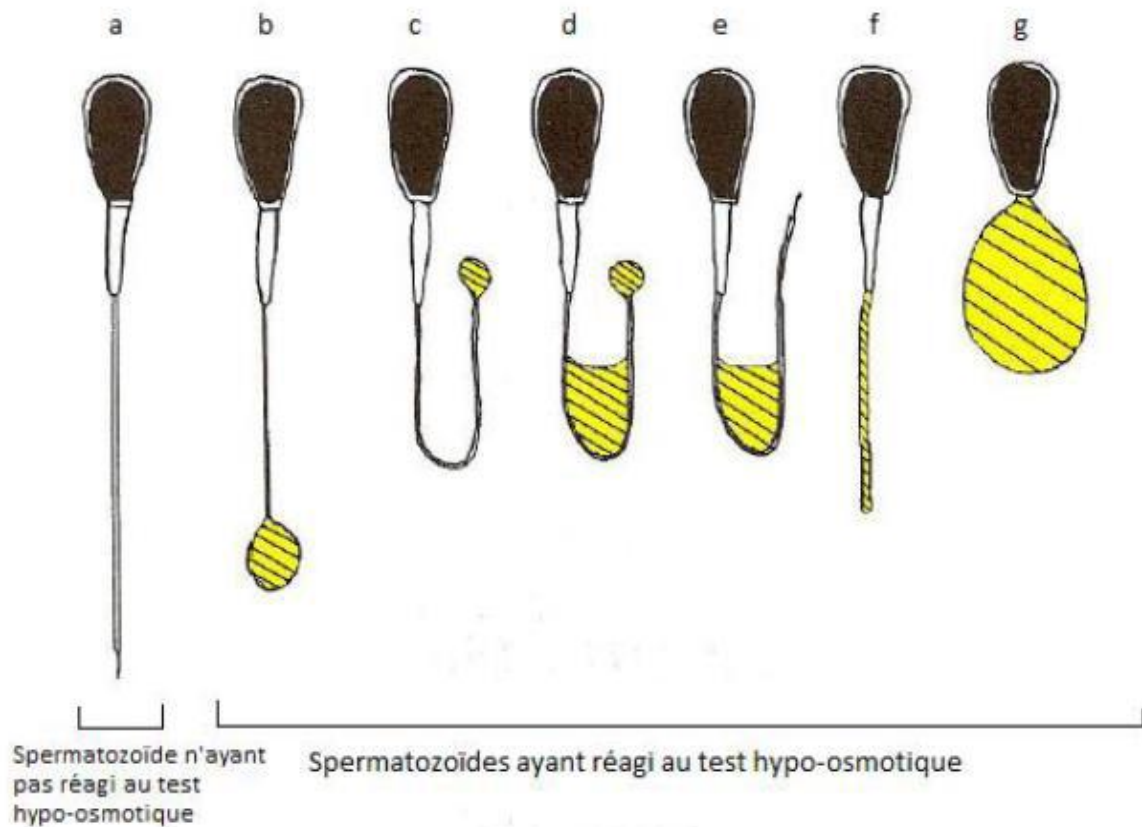


Figure n°11 : Modifications morphologiques des spermatozoïdes soumis au test hypo-osmotique (Jeyendran et al., 1984 ; Christine et al., 2017).

4.4.10. Coloration fluorescente

La coloration fluorescente est utilisée pour évaluer l'intégrité de la membrane plasmatique et l'état de capacitation des spermatozoïdes canins (Rijsselaere et al., 2005). Les spermatozoïdes colorés fluorescents peuvent être évalués pour les aspects fonctionnels et morphologiques sans interférence des milieux extracellulaires. De nombreux colorants fluorescents et combinaisons de fluorophores ont été développés pour évaluer différentes caractéristiques de sperme dans plusieurs espèces de mammifères, qui peuvent être analysés par microscopie à fluorescence ou par cytométrie de flux : proportions de vivants et cellules mortes, fonction mitochondriale, intégrité acrosomale, état de capacité, concentration intracellulaire en calcium des spermatozoïdes, structure de la chromatine des spermatozoïdes et teneur en ADN (Martinez, 2004 ; Arokia et al., 2016).

5. Limites des techniques classiques d'examen de sperme

Le choix de la méthode employée par le laboratoire doit tenir compte du coût de l'analyse, de la facilité de mise en œuvre des techniques mais aussi du nombre d'échantillons à analyser quotidiennement. L'examen de la qualité du sperme est effectué en routine par observation microscopique d'un échantillon par un opérateur, cette méthode dite « classique » peut être mise en œuvre avec un équipement de base peu coûteux. **Cependant, l'examen de routine de la semence (et en particulier l'analyse de la motilité) est par nature un examen subjectif. On déplore une certaine variabilité intra et inter-laboratoires mais également une variabilité intra et inter-opérateurs.** Cette variabilité de l'évaluation des paramètres séminologiques peut avoir des répercussions sur la décision d'utilisation ou de rejet de l'éjaculat et dans le cadre d'échanges commerciaux entre laboratoires ou entre pays.

Des résultats obtenus, dans 10 équipes différentes (Auger *et al.*, 2000), ont conclu que la moyenne des coefficients de variation inter-individuelle était de 22,9% pour l'estimation de la concentration, 21,8% pour la motilité et 17,5% pour la vitalité. Un effet opérateur a été mis en évidence pour la motilité et la vitalité mais pas pour la détermination de la concentration. La variabilité intra-opérateur est d'autant plus élevée que l'opérateur est inexpérimenté. Cette étude souligne donc la nécessité de contrôles internes et externes dans les laboratoires d'analyse de la semence. (Cabannes *et al.*, 2008)

La comparaison entre les méthodes conventionnelles et l'analyse assistée par ordinateur a été effectuée pour l'examen morphologique du sperme (Marnet *et al.*, 2000). La variation intra opérateur est beaucoup plus élevée pour les méthodes conventionnelles d'examen de la morphologie que pour la méthode assistée par ordinateur (coefficient de variation = 0,43 pour 78 les méthodes conventionnelles contre 0,08 pour l'analyse assistée par ordinateur). Cette étude a conclu que l'analyse morphologique assistée par ordinateur présente une valeur prédictive légèrement supérieure aux techniques conventionnelles mais surtout une reproductibilité bien supérieure, permettant la standardisation. Des études sur la comparaison de l'évaluation de la mobilité des spermatozoïdes par des méthodes manuelles et des méthodes assistées par ordinateur (Walker *et al.*, 1982) ont montré que l'exactitude de l'observation visuelle est élevée lorsque le pourcentage de spermatozoïdes doté d'une mobilité progressive et parcourant au moins 30µm / seconde n'est pas compris entre 34 et 57%. En effet, dans cet intervalle, l'évaluation subjective est erronée dans 93% des cas. La motilité est le paramètre le plus subjectif lors de l'évaluation de la qualité de la semence (Cabannes *et al.*, 2008).

6. Analyse du sperme assistée par ordinateur CASA

Les systèmes d'analyse assistée par ordinateur permettent d'analyser de nombreux paramètres (Tels que la concentration, la motilité, la vélocité et la morphologie du spermatozoïde) sur un grand nombre de spermatozoïdes avec une grande répétabilité. Cependant, de nombreux biais peuvent exister. C'est pourquoi, la standardisation et les contrôles qualité sont des pré-requis essentiels. La formation de l'opérateur est également primordiale pour assurer la fiabilité et la répétabilité des résultats. (Cabannes et al., 2008)

La comparaison avec des méthodes manuelles qui ont démontré leur précision et leur fiabilité est essentielle (par exemple la concentration de l'éjaculat évaluée à la cellule 82 hématimétrique). Les méthodes d'utilisation du système doivent être parfaitement définies et clairement décrites, enfin, le traitement des échantillons à analyser (protocoles de lavage, centrifugation, fixation et coloration) doit être standardisé. Toutefois, même s'ils peuvent apporter une certaine objectivité en comparaison à l'examen manuel du sperme, ces analyseurs évaluent les mêmes paramètres que ceux évalués classiquement par l'opérateur, la question de la relation entre les paramètres mesurés et la fertilité reste entière.

L'utilisation de CASA s'est développée ces quinze dernières années parallèlement au développement de la procréation Médicalement Assistée. Le CASA est principalement utilisé lors des tests de préparation de sperme avant l'insémination intra-utérine. **En général cet équipement est utilisé en complément et non en substitution des méthodes d'analyse microscopique.** En clinique vétérinaire, ces appareils peuvent être utiles pour dépister des anomalies de mobilité des spermatozoïdes (Cabannes et al., 2008).

Cependant l'évaluation conventionnelle de la mobilité ou le test de Huhner permettent également de mettre en évidence des troubles graves de la motilité des spermatozoïdes.

D'après les laboratoires d'andrologie, le champ d'application du CASA concerne essentiellement la recherche en reproduction ou les études toxicologiques. Ces appareils ont été mis au point initialement pour un usage en médecine humaine, par la suite ils ont été paramétrés de façon à être utilisables dans différentes espèces animales (dont les espèces bovine, canine, équine) (Cabannes et al., 2008).

Les analyseurs automatiques apportent des précisions utiles concernant la motilité et la morphologie, avec une bonne répétabilité.

Cependant, ils ne peuvent pas se substituer entièrement à l'examen séminologique classique et ne permettent pas de classer les animaux notamment le chien comme « satisfaisant » ou « insatisfaisant » pour la production de sperme l'examen précédant la phase de testage (Palmer, C.W. Barth, A.D.2003 ; Cabannes et al., 2008)



Figure n° 12 : le dispositif CASA. (<https://www.indoreinfertilityclinic.com/male-infertility-test/casa-computerized-semen-analysis-test/>)

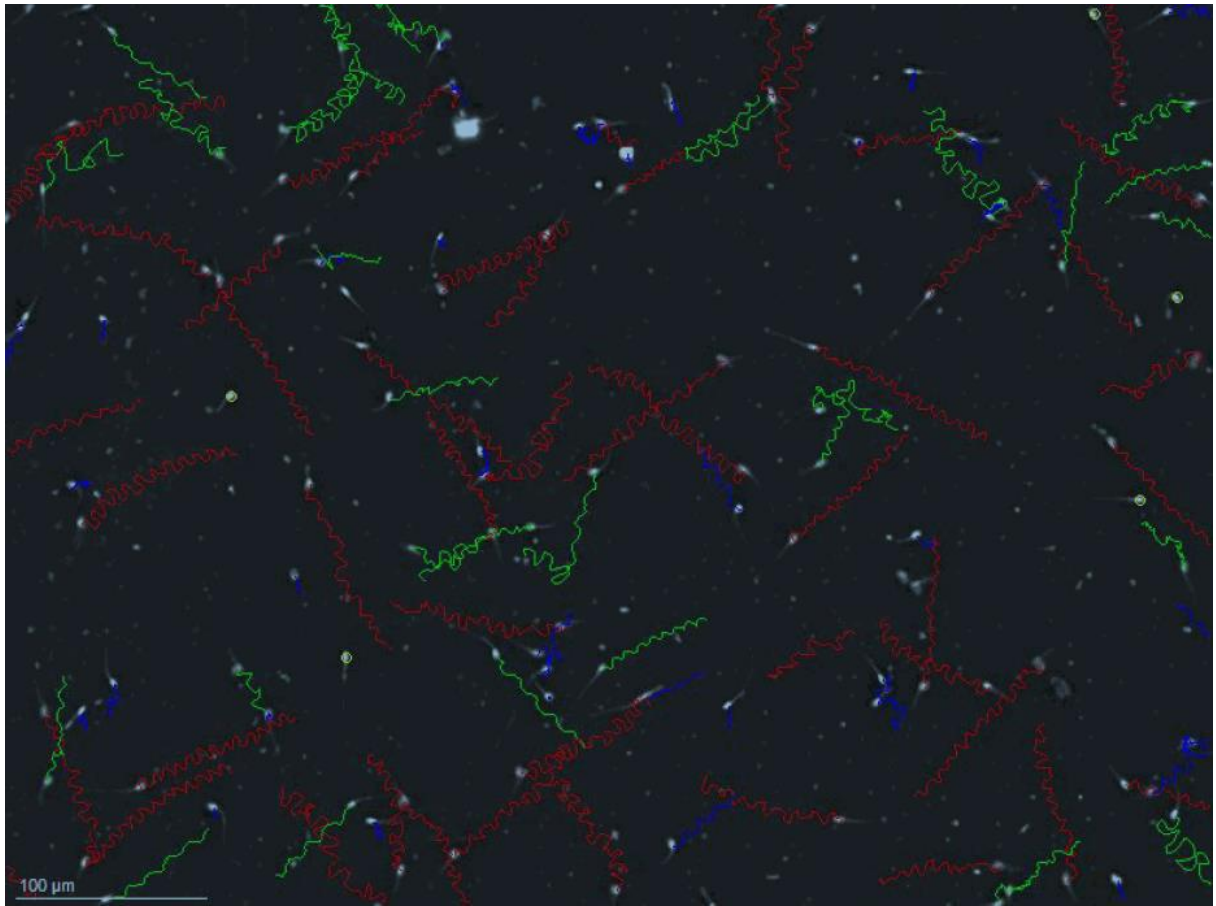


Figure n° 13: image obtenue par le système CASA.

Les trajectoires colorées en rouges correspondent aux spermatozoïdes progressifs rapides, les vertes sont celles des progressifs moyens, et les bleues sont celles des spermatozoïdes mobiles, mais non-progressifs (Sagot, 2019).

7. Bilan sur l'évaluation de la qualité de la semence

La qualité de la semence est généralement évaluée selon 3 grands critères : la mobilité, les anomalies morphologiques et la quantité totale de spermatozoïdes morphologiquement normaux. Le pourcentage de spermatozoïdes mobiles considéré comme satisfaisant est de 70% ou plus. Le taux de spermatozoïdes morphologiquement normaux minimum acceptable est de 60%. La quantité minimale de spermatozoïdes morphologiquement normaux dans un éjaculat est d'environ 220 à 250 millions en semence fraîche (Vivin, 2019).

Chapitre III : Essai d'une méta-analyse

1. OBJECTIF

Les carences alimentaires ont un effet négatif non négligeable dans l'infertilité chez les mâle, plus précisément les le chien, notre démarche pour réaliser l'étude sur l'effet des suppléments des additifs de différente nature (vitamine, acide aminé, hormone, minéraux) et leurs répercussions sur la fertilité, est présentée suivant le détail ci-après :

- trouver une solution de la baisse de la fertilité et la libido chez les chiens, surtout les chiens à haut potentiel génétique ;
- faire des essais de certaines molécules et montrer leurs pouvoir bénéfique dans l'amélioration des caractéristiques de la semence et l'appliquer sur les chiens et d'autre espèces (inclus l'homme) ;
- incorporer les suppléments dans la ration ménagère ou industriel des chiens (par exemple croquette spécial chien sous fertile) ;
- donner aux praticiens des nouvelles méthodes et molécules pour le traitement de l'infertilité chez le chien ;
- utiliser les molécules étudiées comme un moyen de diagnostic de l'infertilité (demander des analyses de vitamine E ou sélénium par exemple) ;

2. Matériel et méthode

Dans le but de recueillir le max d'articles, qui nous aident dans notre étude, On s'est basé dans ce travail sur :

- le moteur de recherche **googlescholar** et **pubmed** ;
- Les langues utilisées sont le français et l'anglais ;
- Utilisation des mots clés pour la recherche comme : semence, semen, infertilité, infertility, dog, chien, reproduction, CASA ;
- On a traité cinq articles récent datent de moins de trois ans.

La durée de ce travail a été trop longue et accompagnée par des grandes coupures suite aux circonstances liées à la pandémie du COVID 19 et aussi des problèmes de comminations avec mon binôme.

Le travail a réellement repris que dans la fin de septembre après les encouragements de mon entourage.

3. Présentation des Résultats

1^{er} Article

"Improving Fertility of Male Dogs = Amélioration de la fertilité des chiens mâles"

Auteurs : Faris A. El-mamlouk, Wael M.B. Noseir, Gamal M. El-Amrawi Department of Theriogenology Faculty of Veterinary Medicine Alexandria University. Egypt.

Source : www.alexjvs.com Alexandria Journal of Veterinary Sciences

L'échantillon : Trente-six (bâtards) chiens ont été utilisés de (2-5) ans.

Le but : étudier les effets de L-carnitine, L-tyrosine et GnRH sur l'amélioration de la fertilité des chiens mâles (Libido et la qualité du sperme). pendant 8 semaines de traitement.

Matériel et méthode : Des échantillons de sérum et de sperme ont été prélevés avant le traitement pour servir de témoin. les animaux ont été regroupés en deux groupes. Le premier groupe (faible libido) se composait de 3 sous-groupes, le premier sous-groupe étant composé de 5 chiens ayant reçu le même régime basal et complétés par 2 g de L-carnitine par tête (Kariniking 50 %) pendant 14 jours. , le deuxième sous-groupe qui a été nourri avec le même régime basal complété par une dose orale unique de L-tyrosine (1 g/10 kg de poids corporel) et le troisième sous-groupe se composait de 5 chiens qui se sont nourris avec le même régime basal et ont reçu une injection de GnRH (réceptacle). 2,5 ml de dose d'amorçage 1 ml une fois par semaine pendant 2 semaines.

Le deuxième groupe (faible qualité de sperme) : composé de 3 sous-groupes chaque groupe se compose de 7 chiens et a reçu le traitement comme le premier groupe.

Résultats : Les résultats ont révélé que, La fertilité des chiens mâles qui représentaient dans les caractères reproducteurs amélioré après le traitement que par le passé, l'amélioration de l'hormone de testostérone, le volume de sperme, le pH et le taux de conception en GnRH suivie de L-groupe traité à la carnitine et les deux améliorent l'efficacité que la L-tyrosine, la GnRH suivie de la L-tyrosine a donné un aspect plus libido que le groupe traité à la L-carnitine. La qualité du sperme dans le deuxième groupe.

Les résultats ont montré que, la concentration significative de spermatozoïdes et les défauts de spermatozoïdes inférieurs observés dans le groupe traité avec la GnRH, suivie par L-carnitine traités groupes, et tous plus élevé que celui de groupe traité par la L-tyrosine seule. Le résultat sur l'hormone de testostérone dans le groupe de faible libido a révélé que, En général, les différents traitements avec L-carnitine, L-tyrosine et GnRH améliorer le niveau de l'hormone de testostérone après le traitement que celui avant le traitement.

2^{ème} Article

"The Effect of Dietary Supplementation of Vitamin E, Selenium, Zinc, Folic Acid, and N-3 Polyunsaturated Fatty Acids on Sperm Motility and Membrane Properties in Dogs = Effet de la supplémentation alimentaire en vitamine E, sélénium, zinc, acide folique et acides gras polyinsaturés N-3 sur la motilité des spermatozoïdes et les propriétés membranaires chez les chiens."

Auteurs : Salvatore Alonge^{1,2,*} , Monica Melandri¹, Raffaella Leoci² , Giovanni M. Lacalandra² , Michele Cairra² and Giulio G. Aiudi²

Source : <https://www.mdpi.com/>

But : Etudier l'effet de la supplémentation alimentaire en vitamine E, sélénium, zinc, acide folique et acides gras polyinsaturés N-3 sur la motilité des spermatozoïdes et les propriétés membranaires chez les chiens.

Matériel et méthode : Seize chiens de différentes races (poids corporel : 8–35 kg, âge : 1,5–5 ans) ont été sélectionnés simultanément, Tous les sujets vivaient à l'intérieur.

Le nombre de patients inclus dans l'étude est 14 chiens.

L'apport quotidien en micronutriments par les aliments était le suivant:

Vitamine E (3 mg / kg de poids corporel (BW));

Zinc (2,4 mg / kg de poids corporel);

Sélénium (0,003 mg / kg de poids corporel);

Acide folique (0,02 mg / kg de poids corporel).

Résultats : Les résultats obtenus dans la présente étude démontrent que l'intégration d'une alimentation saine, enrichie d'un complexe de vitamine E, de sélénium, de zinc, d'acide folique et d'acides gras polyinsaturés n-3, peut augmenter considérablement le nombre de spermatozoïdes et améliorer la motilité et propriétés membranaires de l'éjaculat chez les chiens normospermiques sains.

3^{ème} Article

"Improvement of Sperm Motility Within One Month Under Selenium and Vitamin E Supplementation in Four Infertile Dogs with Low Selenium Status = Amélioration de la

motilité des spermatozoïdes dans un mois sous le sélénium et la supplémentation en vitamine E chez quatre chiens infertiles avec faible statut de selenium”

Auteurs : Anna Domosławska, Sławomir Zduńczyk, Tomasz Janowski

Source : *J Vet Res.* 2019 Jun; 63(2): 293–297. Published online 2019 Jun 12. Journal

But : étudier l’effet d’une supplémentation de sélénium , vitamine E sur la motilité des spermatozoïdes .

L’échantillon : Les mâles suivants ont été utilisés dans l’étude sont 4 chiens (un Golden Retriever, Cocker Spaniel anglais, deux Mastiffs tibétains) de 23kg jusqu’à 64 kg.

Ils ont été référés à la clinique du département de reproduction animale en raison d’un échec de conception lors de leurs trois derniers accouplements avec des chiennes différentes. Avant les accouplements ratés, ces mâles avaient au moins une portée. L’âge des chiens variait de trois à six ans. Les patients étaient en bon état général avec une libido sexuelle normale (comportement sexuel typique lors de l’accouplement naturel et aucun problème de collecte de sperme

Matériel et méthode : Les chiens ont été supplémentés quotidiennement avec du Se (6 µg / kg de sélénium organique de levure) et de la vit. E (5 mg / kg) per os pendant 60 jours (Semevet; VetExpert, Pologne). La préparation contenait également 50 mg d’extrait d’onagre.

Le sperme a été collecté par manipulation manuelle comme décrit par Linde-Forsberg (24) en présence d’une chienne teaser en chaleur aux jours 0, 30, 60 et 90. Les éjaculats ont été collectés dans un verre préchauffé (36–38 ° C) tube.

Les indicateurs de concentration et de motilité du sperme ont été évalués par un analyseur de sperme IVOS, version 12.3 (Hamilton, USA).

Résultats : Cette étude a montré une augmentation rapide de la motilité des spermatozoïdes canins après seulement 30 jours de supplémentation en Se et vit. E suivi de la restauration de la fertilité chez quatre chiens infertiles .Chaque mâle accouplé naturellement avec ou AI avec le sperme de chaque mâle a été pratiqué chez une à quatre chiennes dans une période de 70 jours à compter du début de la supplémentation (un mois après la supplémentation). Toutes les chiennes sont tombées enceintes et ont eu quatre à six chiots dans leurs portées.

"Effects of the supplementation with an high-polyphenols extra-virgin olive oil on kineticspermfeatures and seminal plasma oxidativestatus in healthydogs=Effets de la supplémentation avec une huile d'olive vierge extra-vierge à haute teneur en polyphénols sur les caractéristiques cinétiques du sperme et le statut oxydatif du plasma séminal chez les chiens en bonne santé."

Auteurs : V Tufarelli | A Rizzo | GM Lacalandra | AC Guaricci | V Laudadio | L Valentini

Source : Willy reproduction in domestic animals , Received: 21 December 2017 | Accepted: 7 January 2018.

But: Effets de la supplémentation avec une huile d'olive vierge extra-vierge sur les caractéristiques cinétiques du sperme chez les chiens en bonne santé.

Echantillon : L'étude a été menée sur 12 chiens cliniquement sains de races différentes (2 à 7 ans, 5 à 48 kg de poids corporel) répartis en deux groupes : un groupe expérimental complété par EVOO (cultivar Coratina) riche en polyphénols (H-P) et un groupe témoin nourri d'EVOO (cultivar Cima di Bitonto) faible en polyphénols (L-P).

Matériel et méthode : La collecte de sperme a été effectuée deux fois à une distance de 15 jours (D01 et D02), puis à 30 jours (D30), 60 jours (D60) et 90 jours (D90). La concentration du sperme et les paramètres cinétiques ont été mesurés par ordinateur système d'analyse des spermatozoïdes (CASA) à évaluer : numération totale des spermatozoïdes, motile des spermatozoïdes (MOT%), motilité progressive (PROGR%) et ses fractions, vitesse en ligne droite (VSL, $\mu\text{m/s}$), vitesse curviligne (VCL, $\mu\text{m/s}$), vitesse moyenne du trajet (VAP, $\mu\text{m/s}$), amplitude du déplacement latéral de la tête (ALH, μm), fréquence croisée des battements (BCF, Hz), rectitude (STR%) et linéarité (LIN%). Sur le plasma séminal.

Résultats : les paramètres de sperme de tous les échantillons ont abouti à la gamme des valeurs physiologiques du chien; en particulier, le pourcentage de motilité progressive était de près de 70% et la motilité totale d'environ 100%.

Les résultats actuels ont montré que le complément alimentaire polyphénols peut encore améliorer la motilité des spermatozoïdes, même chez les sujets sains, et puis, ces composés bioactifs pourraient améliorer davantage la performance de reproduction canine, ou chez les chiens dans des conditions de stress chronique.

"Effect of dietary supplementation with omega-3 and -6 on fresh and frozen/thawed sperm quality of dogs = Effet de la supplémentation alimentaire en oméga-3 et en oméga-6 sur la qualité des spermatozoïdes frais et congelés/décongelés des chiens".

Auteurs : Ana Carolina Rodrigues; Camila Montanari Ruiz; Carla Daniela Dan De Nardo; Gabriele Barros Mothé; Fabiano Martinez Rossi; Daniel Bartoli de Sousa; Halim Atique Netto; Fabiana Ferreira de Souza.

Source : semino ; ciéciosagrarias, londrino v38, n5, p3069 année 2017.

But : Effet de la supplémentation alimentaire en oméga-3 et en oméga-6 sur la qualité des spermatozoïdes frais et congelés/décongelés des chiens.

Echantillon : L'étude de 17 semaines comprenait 119 éjaculats et a été divisée en fonction de la supplémentation orale en oméga-3 et -6 : M1 (1^{re} à 5^e semaine) ou de la supplémentation ; M2 (6^e à 9^e semaine) et M3 (10^e à 13^e semaine) ou pendant la supplémentation ; et M4 (14^e à 17^e semaine) ou après la supplémentation.

Matériel et méthode : étude de 17 semaines comprenait 119 éjaculats et a été divisée en fonction de la supplémentation orale en oméga-3 et -6 : M1 (1^{re} à 5^e semaine) ou de la supplémentation; M2 (6^e à 9^e semaine) et M3 (10^e à 13^e semaine) ou pendant la supplémentation; et M4 (14^e à 17^e semaine) ou après la supplémentation. Après analyse, le sperme a été congelé, puis réévalué immédiatement et 30 minutes (à 37 °C) après la décongélation.

Résultats : La supplémentation en omégas augmentait la motilité, la vigueur et la concentration des spermatozoïdes; cependant, la supplémentation n'avait aucune influence sur la libération du sperme. De plus, il n'y a eu aucune amélioration de la motilité des spermatozoïdes après la supplémentation lorsque les cellules décongelées ont été maintenues à 37 °C pendant 30 minutes.

4. Discussion

L'ensemble des articles récents ont prouvés que la supplémentation en vitamine E, zinc, l'acide folique, l'huile d'olive extra vierge, sélénium, tyrosine, L-carnitine, GnRH et les oméga 3 et 6 ont un effet bénéfique pour les caractéristiques spermatique et augmente la fertilité chez les chiens souffrent d'une sous fertilité et aussi pour les chiens qui sont fertiles et les rendent plus performant .

Les études sur la relation entre la nutrition et la fertilité chez le chien nécessitent plus de travail de la part de la communauté scientifique car les mécanismes sont pas bien connus.

Les additifs incorporés dans la ration des chiens présentent une bonne alternative pour le traitement de la sous fertilité, par rapport aux méthodes classiques de traitement.

5. Recommandations :

La sous-fertilité représente un défi courant dans la reproduction canine et peut représenter une grave préoccupation sur le marché de l'élevage canine. A cet effet, une forte coopération entre tous les acteurs de la reproduction canine (vétérinaires, biologistes, zootechniciens, éleveurs et aussi industriels de l'agro-alimentaire) est recommandée afin de développer la reproduction chez le chien.

Investir dans le savoir et le matériel pour le développement des performances de fertilité chez les chiens.

La standardisation des techniques d'évaluation de la semence canine peut nous aider à aboutir à des résultats scientifiques plus fiables.

Les études comparatives et l'application des hautes inventions de biotechnologies de la reproduction humaine mènent à des résultats spectaculaires dans ce domaine.

Une meilleure exploitation de la plateforme de biotechnologies de reproduction canine de l'Université de Blida nous donne de l'avantage et de l'avance dans l'application des études scientifiques expérimentales de haut niveau, du fait, que cette plateforme contienne du matériel sophistiqué.

Références bibliographiques

- AUGER, J; EUSTACHE, F. Standardisation de la classification morphologique des spermatozoïdes humains selon la méthode de David modifiée. *Andrologie*, 2000, 10, 358-373.
- M. Arokia Robert 1, G. Jayaprakash2, Mayur Pawshe3, T. Tamilmani4, and M. Sathiyabarathi5 Article 2018 publié sur : *International Journal of Science, Environment ISSN 2278-3687 (O) and Technology*, Vol. 5, No 3, 2016, 1586 – 1595 "Collection and evaluation of canine semen-a review",
E-mail: arokiarobert@gmail.com
- Amélie DELOMPRÉ ; ENV ALFOR, TH : Doctorat vétérinaire 2011, "les chiens sentinelles du risque sanitaire d'origine environnementale : recherche de liens entre facteurs environnementaux et défauts de fertilité chez les animaux mâles".
- Carole, Rosinpaer CABANNES, ENV Toulouse Th Doctorat vétérinaire 2008, "Comparaison des méthodes d'évaluation de la qualité de la semence dans les espèces bovine, canine et humaine".
- Christine, CLAIRE, Antoinette GILBERT : ENV ALFORT, TH ;Doctorat vétérinaire, 2017 "Effet de l'acétate d'osatéronne (ypozane®) sur la qualité de semence chez le chien".

- COOPER T., NOONAN E., VON ECKARDSTEIN S., AUGER J., BAKER G., BEHRE H., HAUGEN T., KRUGER T., WANG C., MBIZVO M., VOGELSONG K. World health organization reference values for human semen characteristics. Human reproduction update advance, 2009, 1-15.
- COLAGAR A. MARZONY E. CHAICHI M. Zinc levels in seminal plasma are associated with sperm quality in fertile and infertile men. Nutrition research, 2009, 29 (2), 82-88.
- DADOUNE, J.-P., HADJIISKY, P., SIFFROI, J.-P., 1990. Histologie / Jean-Pierre Dadoune, Peter Hadjiisky, Jean-Pierre Siffroi,... [et al.]. Collection De la biologie à la clinique. Flammarion. Paris.
- Ellington, J., Scarlett, J., Meyers-Wallen, V., Mohammed, H.O. and Surman, V. 1993. Computer-assisted sperm analysis of canine spermatozoa motility measurements. Theriogenology. 40: 725–733.
- England, G.C.W. and Allen, W.E. 1992. Factors affecting the viability of canine spermatozoa i. potential influences during processing for artificial insemination. Theriogenology. 37: 363-371.
- England, G.C.W. and Plummer, J.M. 1993. Hypo-osmotic swelling of dog spermatozoa. J. Reprod. Fertil. 47(Suppl.): 261–70.
- ENGLAND G. (2012). Dog breeding, whelping, and puppy care, Wiley-Blackwell (Verlag), 1st Edition, 344p.
- Feldman, E.C. and Nelson, R.W. 1996. Clinical and diagnostic evaluation of the malereproductive tract. In Canine and Feline Endocrinology and Reproduction. W.B. Saunders, Philadelphia, pp. 673-690.
- FONTBONNE A. Infécondité du chien mâle. Encyclopédie vétérinaire, 1999, n°1900, 13.
- FONTBONNE A. Faire reproduire son chien ou sa chienne, les clefs d'une pratique réussie. Editions Maradi, 1996, 4, 192-202.
- FORGES T. PELLANDA H. DILIGENT C. MONNIER P. GUEANT J-L. Les folates : quel impact sur la fertilité ? Gynécologie Obstétrique & fertilité, 2008, 36 (9), 930-939.
- Inamassu, A., Vechi, E. and Lopes, M.D. 1999. Investigation of the viability of the hypoosmotic test and the relationship with some spermatoc characteristics. Rev. Bras. Reprod. Anim. 23: 302–304.
- Iguer-ouada, M. and Verstegen, J.P. 2001. Validation of the sperm quality analyzer (SQA) for dog sperm analysis. Theriogenology. 55: 1143–1158.
- JEYENDRAN RS., VAN DER VEN HH, PEREZ-PELAEZ M., CRABO B.G., ZANEVELD IJ. (1984) Developpement of an assay to assess the functional integrity of the

human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J. Reprod. Fertil.*, 70, 219-228,

- Johnston, S.D. New canine semen evaluation techniques for the small animal practitioner. In *Proceedings of the Annual Meeting, Society for Theriogenology, Coeur d'Alene, ID, 1989*, pp. 320-326.
- Johnston, S.D. 1992. Performing a complete canine semen evaluation in a small animal hospital. *Vet. Clin. North. Am (Small AnimPract)*. 21:545–551.
- Johnston, S.D., Kustritz, M.V.R. and Olson, P.N.S. 2001. Semen collection, evaluation, and preservation. In *Canine and Feline Theriogenology*. W.B. Saunders, Philadelphia, pp 287-306.
- KNOBIL, E., D. NEILL, J., 1998. *Encyclopédie of Reproduction*. Academic Press, New York.
- Kumi-Diaka, J. 1993. Subjecting canine semen to the hypo-osmotic test. *Theriogenology*. 39: 1279–1289.
- Kurni-Diaka, J. and Badtram, G. 1994. Effect of storage on sperm membrane integrity and other functional characteristics of canine spermatozoa: in vitro bioassay for canine semen. *Theriogenology*. 41: 1355–66.
- LAING J.A., MORGAN W.J.B., WAGNER W.C. *Fertility and infertility in veterinary practice*. Bailliere tindall, 1988.
- Larsen, R.E. 1980. Infertility in the male dog. In: Morrow, D.A. (ed.), *Current Therapy in Theriogenology (2nd Ed)*. W.B. Saunders Company, Philadelphia, pp. 646–654.
- Leboeuf B, Restall B, Salamoun S, 2003. «Production et conservation de la semence de bouc pour l'insémination artificielle ». *INRA Prod. Anim.*, 16 (2), 91-99.
- Martinez, A.L.P. 2004. Canine fresh and cryopreserved semen evaluation. *Anim. Reprod. Sci.* 82–83: 209–224.
- MENEZO Y. COHEN M. <http://www.gynazur-2009.com/spip.php? article34>, page consultée le 6/10/10, diminution de la qualité de la spermatogenèse : mythe ou réalité. *Les approches thérapeutiques*.
- MARNET, B; VIEITIEZ, G; MILHET, P et al. Computer-assisted assessment of sperm morphology : comparison with conventional techniques. *International Journal of Andrology*, 2000, 23, 22-28.
- Oettle, E.E. 1993. Sperm morphology and fertility in the dog. *J Reprod. Fertil.* 47(Suppl): 257–260.

- OTT RS., GOFFAUX M., THIBIER M. (1987) Examen morphologique des spermatozoïdes. *El. et Ins.*, 221, 15-20.
- Pinto, C.R.F., Wrench, N. and Schramme, A. 2005. Simplified hypo-osmotic testing of canine spermatozoa. *Theriogenology*. 64: 811 [Abstract].
- PALMER, C.W; BARTH, A.D. Comparison of the BullMate™ Sperm Quality Analyser with conventional means of assessing the semen quality and breeding soundness of beef bulls. *Animal Reproduction Science*, 2003, 77, 173-185.
- Rijsselaere, T., Van Soom, A. and Tanghe, S. 2005. New techniques for then assessment of canine semen quality: a review. *Theriogenology*. 64: 706–719.
- Rodriguez-Gil, J.E., Monserrat, A. and Rigau, T. 1994. Effects of hypoosmotic incubation on acrosome and tail structure on canine spermatozoa. *Theriogenology*. 42: 815– 829.
- SAGOT Cécile : ENV LYON , TH : Docteur Vétérinaire 2012, "Cryoconservation de la semence canine : étude de l'influence des conditions de décongélation sur la mobilité des spermatozoïdes".
- Threlfall, W.R. 2003. Semen collection and evaluation. In: Root Kustritz M.V. (ed.), *The practical veterinarian: Small Animal Theriogenology*. St. Louis: Butterworth-Heineman, pp. 97– 123.
- VIVIN Fiona ENV LYON 2019 - Th Doctorat Vétérinaire, "Analyse des facteurs de performance en insémination artificielle canine. Application aux données du cerrec".