

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE SAAD DAHLAB - BLIDA 1



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Biologie

Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme de Master dans le domaine SNV
Filière Sciences Biologiques

Option : biologie et physiologie de la reproduction

Thème

**Optimisation des paramètres cinétiques du sperme canin évalué
par le système (CASA HT IVOS II)**

Présenté par : ARKOUB MOHAMED KARIM

Date de soutenance : 27/07/2022

Devant le jury :

Mr BESSAAD A.

MCA/USDB1

Président

Mme BENZAOUZ F.

MAA /USDB1

Examinatrice

Mr. BELALA R.

MCA/ USDB1

Promoteur

Promotion : 2021-2022

REMERCIEMENT

Je remercie en premier lieu dieu le clément miséricordieux qui par sa grâce, j'ai réalisé ce modeste travail.

J'adresse mes remerciements à mon promoteur **Dr BELALA REDHA** « **MCA**, enseignant à ISV BLIDA » pour avoir dirigé notre présent travail, pour ses encouragements et son sourire rassurant. Qu'il veuille bien recevoir ici l'expression de notre profond respect.

Je remercie **Mr BESSAAD M.A.** « **MCA SNVB1** » et **Mme BENAZOUZ F.** « **MAA SNVB1** » d'avoir acceptés de faire partie de notre jury ; malgré leurs obligations. Je les remercie pour leurs efforts dans les cours tout le long de l'année, qu'ils veuillent bien recevoir ici l'hommage de notre profond respect.

Je remercie particulièrement **Mr BELALA Redha** le Directeur de la plateforme de biotechnologie et reproduction des carnivores (P.B.R.C) de l'université de Blida1 pour nous avoir donné l'accès aux équipements de recherche nécessaires à la réalisation de ce travail.

Je remercie **Mlle MIRA MEDJKOUNE** pour son aide précieuse, en lui souhaitant de meilleurs exploits dans sa nouvelle vie professionnelle.

Je remercie les étudiants de « **Master 2 BPR** », que soit associé à ces remerciements, l'ensemble du corps enseignant de **SNV-BLIDA**

A tous ceux qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

REMERCIEMENT

- A MONSIEUR LE DIRECTEUR GENERAL DE LA SURETE NATIONALE.
- A MONSIEUR LE DIRECTEUR DE LA SECURITE PUBLIQUE.
- A MONSIEUR LE DIRECTEUR DES UNITES REPUBLICAINES DE SECURITES.
- A MONSIEUR LE DIRECTEUR DES ESEIGNEMENTS ET DES ECOLES.
- A MONSIEUR LE DOYEN DE SNV BLIDA.

DEDICACES

Je dédie ce travail en signe de reconnaissance,

A ma mère,

Que ce travail soit un bien faible hommage à ton amour infini et ton soutien sans faille tout au long de ma vie. Rien n'aurait été possible sans toi. Je t'aime.

A mon père,

Tu sais que je te dois - presque !- tout ce que je suis. Tu es pour moi et à tout jamais le meilleur papa possible. Que ce modeste travail, auquel tu as contribué, représente une part infime de ma tendresse, de mon admiration, de mon respect et de tout mon amour.

A MES FRANGINES

Merci pour tout pour m'avoir toujours soutenu.

A mon EPOUSE pour son amour, son soutien et son encouragement, je t'aime.

A mes chers enfants Kamelia, Abderrahmane et Abdelmalik je vous aime.

SOMMAIRE

INTRODUCTION	1
1. L'appareil Genital Male.....	3
1.1. Les testicules et les voies spermatiques	3
1.1.1. Rappels anatomiques	3
1.1.2. La spermatogenèse	4
1.1.3. La Spermacytogénèse.....	5
1.1.4. Régulation de la spermatogenèse.....	6
1.1.5. La maturation des spermatozoïdes	9
1.1.6. Les glandes annexes	9
1.2. Physiologie de l'accouplement	10
2. La semence canine.....	12
2.1. Caractéristiques générales de la semence canine.....	12
2.2. Composition de la semence canine	14
2.3. Facteurs de variation des caractéristiques de la semence canine.....	20
3. Evaluation de la semence canine	27
3.1. Les examens utilisés en routine	27
3.1.1. Examens macroscopiques	27
3.1.2. Examens Microscopiques.....	29
3.1.3. Le test hypo-osmotique	33
3.1.4. Spermocytogramme (morphologie du spermatozoïde).....	34
3.1.5. L'analyseur d'images automatisé	37
1. MATERIELS ET METHODES.....	41
1.1. Lieux d'expérience	41
1.2. Matériels	41

1.2.1. Matériel Biologique.....	41
1.2.2. Matériels.....	42
1.3. Méthodes	46
1.3.1. Récolte de la semence	46
1.3.2. Evaluation initiale de la semence	47
1.4. Protocole expérimental	55
1.5. Saisie des données	57
1.6. Analyse statistique	57
2. RESULTATS.....	58
2.1. Etude préliminaire.....	58
2.1.1. Evaluation de l'effet des paramètres de détection cellulaire	58
2.1.2. Choix des facteurs de détection cellulaire à étudier	58
2.2. Etude et optimisation des paramètres de détection cellulaire.....	59
2.3. Effet du paramétrage de détection cellulaire sur les paramètres cinétiques	73
3. DISCUSSION.....	75
CONCLUSION	81
RECOMMANDATIONS	82
BIBLIOGRAPHIE.....	83

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

MATERIELS ET METHODES

RESULTATS ET DISCUSSION

LISTE DES FIGURES

Figure n°1 : Schéma de l'appareil génital du chien.....	4
Figure n°2 : Etapes de la spermatogenèse.....	5
Figure n°3 : Modifications morphologiques des cellules germinales au cours de la spermiogénèse.....	6
Figure 4 : Régulation de la spermatogénèse par les hormones mâles.....	8
Figure 5 : Schéma de l'irrigation de la prostate du chien.....	10
Figure n°6 : Les trois phases de l'éjaculat du chien.....	13
Figure 7 : Schéma d'une coupe longitudinale d'un spermatozoïde ; trois niveaux du flagelle sont représentés en coupe transversale.....	16
Figure n°8 : Schéma du spermatozoïde de mammifère.....	19
Figure n°9 a : Matériel de récolte manuelle de la semence canine.....	23
Figure n°9 b : Etuve contenant les cônes en caoutchouc et les tubes stériles à 37°C.....	24
Figure n°10 a : début de la récolte. La tête du chien est maintenue par le propriétaire et orientée vers l'arrière train de la femelle. Massage en arrière des bulbes, retrait du fourreau et application d'une pression en arrière des bulbes.....	26
Figure n°10 b : soulèvement d'un postérieur.	26
Figure n°10 c : orientation caudale du pénis.....	27
Figure n°11 : Microscope à platine chauffante	30
Figure n°12 : (12a) Cellule de Neubauer modifiée et son quadrillage - (12b) Cellule de Malassez et son quadrillage.....	32
Figure n°13 : Les modifications morphologiques des spermatozoïdes soumis au test Hypo-osmotique.....	34
Figure n° 14 : Principales anomalies morphologiques des spermatozoïdes.....	36
Figure 15 : Hamilton-Thorne IVOS II.....	37
Figure 16 : Cellule de Leja® à quatre chambres.....	38

Figure 17 : Représentation schématique des trois vitesses étudiées chez les spermatozoïdes	39
Figure 18 : Plateforme (PBRC) de l'université de Blida1.....	41
Figure 19 : photos des chiens inclus dans la partie expérimentale.....	42
Figure 20 : Etuve, matériel de récolte et bain marie.....	43
Figure 21 : Photomètre calibré de marque SDM1 MINITUB.....	43
Figure 22 : microscope optique de marque NIKON E100 à platine chauffante.....	44
Figure 23 : L'analyseur Hamilton-Thorne IVOS II.....	44
Figure 24 : Cellule de Leja® à quatre chambres.....	45
Figure 25 - Matériel nécessaire pour le comptage des cellules.....	45
Figure n° 26 : différents matériels utilisés pour l'analyse de la semence.....	46
Figure n° 27 : la récolte de sperme chez le chien.....	47
Figure n° 28 : Les trois différentes fractions spermatiques recueillies chez le chien.....	47
Figure n° 29 : Le photomètre SDM1, Minitub.....	48
Figure °30 : Dépôt d'une goutte de semence sur une lame pour évaluation.....	49
Figure 31 : comptage des spz.....	50
Figure 32 : sens de comptage.....	50
Figure 33 : Etapes de dilution de la semence.....	52
Figure 34 remplissage de la lame Leja.....	53
Figure n° 35 : les paramètres générés par le système CASA IVOS II.....	54
Figure n° 36 : setting recommandé par le fabricant	55
Figure n° 37 : protocole expérimental.....	56
Figure n° 38 : Effet de la brillance « MHB » sur la détection des spz canin par le système HT-IVOS II «Par l'outil auto-configuration du système».....	58
Figure n° 39 : Le setting de détection cellulaire du système HT-IVOS II recommandé par le fabricant (IMV Technologies).	58
Figure n° 40 : Effet de variation « 100-200 » de la brillance minimale « HBM » sur la concentration des spz canins analysés par le système HT-IVOS II. Des lettres différentes signifient une différence significative à $p < 0.05$ (n=20).	60
Figure n° 41 : Effet de 3 valeurs de de la brillance minimale « HBM : 187, 140 et 120 » sur la concentration des spz canins analysés par le système HT-IVOS II. Des lettres différentes signifient une différence significative à $p < 0.05$ (n=20).	61

Figure n° 42 : Effet de variation « 2-16, μm^2 » de la taille minimale du spz « AREA » avec la brillance minimale « HBM » fixée à 187 sur la concentration des spz canin analysés par le système HT-IVOS II. Aucune DS n'a pu être identifiée $p=0.803$ ($n=20$).	62
Figure n° 43 : Effet de variation « 2-16, μm^2 » de la taille minimale du spz « AREA » et HBM fixé à 120 sur la concentration des spz canin analysés par le système HT-IVOS II. Aucune DS n'a pu être identifiée $p=0.802$ ($n=20$).	63
Figure n° 44 : Effet de variation « 2-16, μm^2 » de la taille minimale du spz « AREA » et HBM fixé à $140\mu\text{m}^2$ sur la concentration des spz canin analysés par le système HT-IVOS II. Aucune DS n'a pu être identifiée $p=0.149$ ($n=20$).	64
Figure n° 45 : Effet de variation « 2-16, μm^2 » de la taille minimale du spz « AREA » et HBM fixé à $140\mu\text{m}^2$ sur la concentration des spz canin analysés par le système HT-IVOS II. Aucune DS n'a pu être identifiée $p=0.149$ ($n=20$).	65
Figure n° 46 : Droite de régression linéaire entre la concentration des spz canins analysés par le système HT-IVOS II « HBM : 140 ; AREA : $6\mu\text{m}^2$ » et la numération à la cellule de Neubauer. $p=0.149$ ($n=20$).	66
Figure n° 47 : Droite de régression linéaire entre la concentration des spz canins analysés par le système HT-IVOS II « HBM : 140 ; AREA : $4\mu\text{m}^2$ » et la numération à la cellule de Neubauer. $p=0.149$ ($n=20$).	67
Figure n° 48 : Droite de régression linéaire entre la concentration des spz canins analysés par le système HT-IVOS II « HBM : 120 ; AREA : $4\mu\text{m}^2$ » et la numération à la cellule de Neubauer. $p=0.149$ ($n=20$).	68
Figure n° 49 : Droite de régression linéaire entre la concentration des spz canins analysés par le système HT-IVOS II « HBM : 120 ; AREA : $6\mu\text{m}^2$ » et la numération à la cellule de Neubauer. $p=0.149$ ($n=20$).	69
Figure n° 50 : Concentration spermatique analysée par le système HT-IVOS II « avec paramétrages standard et ajusté ; HBM-AREA : 187-16, 140-4 » le photomètre SDM calibré pour semence canine et la numération à la cellule de Neubauer ($n=20$).	71
Figure n° 51 : Droite de régression linéaire entre la concentration des spz canins analysés par le système HT-IVOS II « HBM : 140 ; AREA : $4\mu\text{m}^2$ » et le photomètre SDM calibré pour semence canine ($n=20$).	72
Figure n° 52 : Effet de 3 paramétrages de l'IVOS II sur les pourcentages de mobilité totale (MOT, %) et progressifs (PROG, %) des spz canins.....	74

LISTE DES TABLEAUX

Tableau n°1 : Description des trois phases de l'éjaculat du chien.....	13
Tableau 2 : Anomalies du volume de l'éjaculat.....	28
Tableau 3 : Modification de la couleur de la semence canine.....	29
Tableau 4 : Echelle d'appréciation de la mobilité massale de la semence canine, dérivée de l'échelle de Milovanov.....	30
Tableau 5 : Classification des anomalies morphologiques des spermatozoïdes.....	35
Tableau n°6 : identification de chaque animal.....	41
Tableau 7 : Différences acceptables entre deux comptes de réplique pour une somme donnée sur la base de l'intervalle de confiance arrondi à 95%.....	51
Tableau n° 8 : Concentration spermatique analysée par le système HT-IVOS II avec 5 paramètres différents « HBM-AREA : 187-16, 140-4, 140-6, 120-4 et 120-6 » et la numération à la cellule de Neubauer (n=20).....	70
Tableau n° 9 : Corrélation de Pearson croisés entre la concentration des spz canins analysés par le système HT-IVOS II avec 5 paramètres différents « HBM-AREA : 187-16, 140-4, 140-6, 120-4 et 120-6 » et la numération à la cellule de Neubauer. (n=20).....	70
Tableau n°10 : Corrélation de Pearson croisés entre la concentration des spz canins analysés par le système HT-IVOS II avec « 2 paramètres standard et ajusté ; HBM-AREA : 187-16, 140-4 », le photomètre SDM calibré pour semence canine et la numération à la cellule de Neubauer (n=20).....	72
Tableau n°11 : Moyennes des pourcentages de motilité (MOT, %) et de progressivité (PROG, %) analysés par le système HT-IVOS II avec plusieurs paramètres à 3 valeurs de brillance minimale « HBM : 187, 140, 120 » (HBM, n=160 ; AREA, n=180).....	73

LISTE DES ABREVIATIONS

µm : Micromètre

µm/s : Micromètre par seconde

ABP : Androgen Binding Protein (protéine de liaison aux androgènes)

ACP : Analyse en Composante Principale

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

ALH : Amplitude Latéral Head (amplitude latérale de la tête)

AMPc : Adénosine MonoPhosphate cyclique

AO : Acridine Orange

ATP : Adénosyl Triphosphate

BCF : Beat Cross Frequency

DMSO : Diméthylsulfoxyde

ELON : Elongation

FITC : Isothiocyanate de fluorescéine

FSH : Follicle Stimulating Hormone (hormone de stimulation des follicules)

GnRH : Gonadotropin-Releasing Hormone (hormone de libération des gonadotropines)

HOS : Hypo-Osmotic Swelling

Hz : Hertz

LDL : Low Density Lipoprotein (protéine de basse densité)

LH : Luteinizing Hormone (hormone luthéinisante)

LIN : Linearity (linéarité)

nm : Nanomètre

pH : Potentiel Hydrogène

PI : Iodure de Propidium

PNA : Peanut Agglutinin

PROG : Mobilité progressive

PSA : Pisum Sativum Agglutinin

QSP : Quantité Suffisante Pour

Spz : Spermatozoïde

STP : Straightness (rectitude)

VAP : Velocity Average Pathway (vitesse progressive moyenne)

VCL : Velocity Curvilinear Line (vitesse curvilinéaire)

VSL : Velocity Straight Line (vitesse linéaire)

Résumé

La présente étude consiste en un essai d'optimisation du paramétrage technique du système HT-IVOS II dans l'analyse des spz canins. Elle vise l'ajustement des paramètres de détection cellulaire et l'évaluation de leurs effets sur la concentration et la mobilité. Pour ce faire, 20 éjaculats (n=20) ont été collectés à partir de 6 chiens, puis soumis à une évaluation microscopique de la mobilité, une mesure de la concentration par photomètre « SDM1 », une numération cellulaire par cellule de Neubauer et une analyse cinétique et morphométriques par HT-IVOS II. Chaque analyse IVOS est enregistrée, puis la vidéo ré-analysée en changeant 2 paramètres de détection cellulaire, la brillance « HBM » et la taille « AREA » minimale de la tête du spz. Sept valeur de HBM « 100-200 » et 8 valeurs de AREA « 2-16 μm^2 » ont été évaluées. Le facteur AREA a été croisé par 3 valeurs du facteur HBM (témoin et 2 valeurs optimales) donnant ainsi un factoriel 8x3. Au total 27 settings ont été utilisés et 560 analyses IVOS réalisées. Les données brutes ont été analysées statistiquement « IBM, SPSS » comparativement à la technique de référence « Neubauer » et les résultats ont permis de mettre en évidence un effet très significatif sur la concentration et la mobilité. Un paramétrage optimal « HBM : 140 et AREA : 4 μm^2) de détection cellulaire a été retenu et proposé.

Mots clés : Chien - Spermatozoïde – CASA – Paramétrage technique – Concentration – Analyse cinétique

ملخص

تتكون الدراسة الحالية من اختبار التحسين للمعلمات التقنية لنظام HT-IVOS II في تحليل spz للكلاب. يهدف إلى ضبط معلمات الكشف عن الخلايا وتقييم آثارها على التركيز والحركة. للقيام بذلك، تم جمع 20 قذفاً (ن = 20) من 6 كلاب، ثم خضعت للتقييم المجهرى للحركة، وقياس التركيز بواسطة مقياس الضوء «SDM1»، وعدد الخلايا بواسطة خلية نيوباور، والتحليل الحركي والمورفومتري بواسطة HT-IVOS II. يتم تسجيل كل تحليل IVOS، ثم يتم إعادة تحليل الفيديو عن طريق تغيير معلمتين للكشف عن الخلية، وسطوع "HBM" والحد الأدنى لحجم "AREA" للرأس. تم تقييم سبع قيم لـ "100-200" HBM و 8 قيم لـ "2-16µm²" AREA تم عبور عامل AREA بثلاث قيم لعامل HBM (التحكم والقيمتين الأمثل) مما يعطي عامل 3.8 تم استخدام ما مجموعه 27 إعدادًا وإجراء 560 تحليل. IVOS تم تحليل البيانات الأولية إحصائياً IBM، "SPSS مقارنة بالتقنية المرجعية "Neubauer" وأظهرت النتائج تأثير معنوي كبير على التركيز والتنقل. تم اختيار واقتراح الإعداد الأمثل HBM: 140 و AREA: 4 ميكرومتر مربع) للكشف عن الخلايا.

الكلمات المفتاحية: الكلب - الحيوانات المنوية - CASA - المعايير الفنية - التركيز - التحليل الحركي

Abstract

The present study consists of an optimization test of the technical setting of the HT-IVOS II system in the analysis of canine spermatozoa. It aims to adjust cell detection parameters and assess their effects on concentration and mobility. To do this, 20 ejaculates (n=20) were collected from 6 dogs, then subjected to a microscopic evaluation of motility, a concentration measurement by "SDM1" photometer, a cell count by Neubauer cell and a kinetic and morphometric analysis by HT-IVOS II. Each IVOS analysis is recorded, and then the video re-analyzed by changing 2 cell detection parameters, the "HBM" brightness and the minimum "AREA" size of the spz head. Seven values of HBM "100-200" and eight values of AREA "2-16 μm^2 " were evaluated. The AREA factor was crossed by three values of the HBM factor (control and 2 optimal values) thus giving an 8x3 factorial. A total of 27 settings were used and 560 IVOS analyzes performed. The raw data was statistically analyzed "IBM, SPSS" compared to the reference technique "Neubauer" and the results revealed a very significant effect on concentration and mobility. An optimal setting ("HBM: 140 and AREA: 4 μm^2) for cell detection was selected and proposed.

Keywords: Dog - Sperm - CASA - Technical parameters - Concentration - Kinetic analysis

Introduction :

Les biotechnologies liées à la semence canine sont d'un intérêt indéniable pour la réussite de la reproduction et des programmes d'élevage recrutant des reproducteurs « géniteurs » de grande valeur génétique et notamment utilitaire tel que les chiens de travail employés à des fins d'investigation, de recherche et de lutte contre la criminalité **(Belala, 2016)**.

En Algérie, la Sûreté Nationale connaît parfaitement la valeur de la ressource canine et utilise depuis longtemps le chien de recherche comme auxiliaire au policier dans l'accomplissement de ses missions. Elle travaille également pour le lancement d'un programme d'élevage et de reproduction visant à couvrir ses besoins opérationnels en ressource canine comme alternative à l'importation.

La maîtrise des méthodes d'analyse de la semence canine s'avère être un prérequis à la réussite de ce programme de reproduction et d'élevage à visée sécuritaire. La mesure de la concentration des spermatozoïdes et l'analyse de leur mobilité revêtent une importance capitale dans l'évaluation de leur pouvoir fertilisant **(L.Post ; 2019)**.

La mobilité est classiquement évaluée de façon subjective par observation microscopique conduisant à beaucoup d'imprécision et de variabilité dans les résultats **(L.Post ; 2019)**. Quant à la concentration, la technique de référence étant la numération cellulaire par l'hématimètre de Neubauer **(OMS, 2021)**. Cette technique est très précise quand elle est réalisée par une personne hautement expérimentée, mais très chronophage et contraignante par la fatigue visuelle et la mobilisation du personnel. Elle peut aussi souffrir de subjectivité par inexpérience du manipulateur **(Bioforma 2009)**.

L'analyseur assisté par ordinateur (système CASA) est une bonne alternative aux techniques classiques et subjectives d'évaluation microscopique de la mobilité. Il présente l'avantage de la rapidité, l'automatisation, la précision et la répétabilité par rapport aux inconvénients de la technique classique **(L.Post ; 2019)**.

Cependant, si le système CASA s'avère être fiable pour l'analyse de la mobilité par rapport à l'œil humain, il n'existe pas encore de consensus sur sa fiabilité dans la mesure de la concentration. En effet, les valeurs obtenues sont souvent surestimées ou sous-estimées comparées à la technique de référence **(Maes et al. 2010 ; Fdailaine, 2017 ; Tahloult et al., 2019 ; Shubert et al., 2019)**.

Les limites du système CASA sont attribuables à plusieurs facteurs pré-analytiques tenant aux erreurs humaines de manipulation et de préparation de la semence, mais aussi à d'autres facteurs liés aux conditions d'analyse CASA tel que le choix de la chambre d'analyse et sa profondeur, la température et la concentration d'analyse, la solution de dilution utilisée et tant d'autres facteurs largement étudiés dans la littérature (**Birks et al., 1994 ; Farrell et al., 1996 ; Iguer-Ouada et Verstegen, 2001, 2005 ; Rijsselaere, 2003, 2005, 2012 ; Bailey et al., 2007 ; Dorado et al., 2011 ; Vanderhost et al., 2014 ; Siminiki et al., 2015**).

Néanmoins, les facteurs liés au paramétrage technique de l'analyseur (Setting préétabli du logiciel d'analyse d'image) n'ont pas été suffisamment explorés depuis les études de validation du système IVOS et CEROS pour l'analyse des spz canins ayant conduit à la proposition de setting considéré encore comme paramétrage standard recommandé par le fabricant (**Igue-Ouada et Verstegen, 2001 ; Rijsselaere et al., 2003, 2005**). Très récemment, O'meara et ses collaborateurs (2021) ont essayé d'ajuster le paramétrage cinématique et morphométrique de l'analyseur HT-IVOS II utilisé pour l'analyse des spz bovins congelés, et ont étudié l'effet sur les paramètres générés par ce système (**O'meara et al. 2021**).

Le paramétrage cinématique n'est autre que la définition des seuils « préétablis » de vitesses, (VSL, VAP, $\mu\text{m/s}$) et de rectitude (STR%) qui seront utilisés par l'IVOS comme critères de classification des spz en différentes catégories dont essentiellement les statiques, les mobiles et les progressifs. Dans l'étude d'O'meara et ses collaborateurs (2021), le paramétrage cinématique n'a eu aucun effet sur la concentration spermatique, ce qui était prévisible, même pour les auteurs.

Notre hypothèse est que, contrairement au paramétrage cinématique, les paramètres de détection cellulaire et notamment la brillance (contraste) et la taille de la tête du spz auront un impact direct sur la concentration et la mobilité par voie de conséquence. A la limite de notre connaissance, aucune étude n'a encore porté sur l'optimisation du paramétrage de détection cellulaire du système HT-IVOS II dans l'analyse des spz canins.

Ainsi, le présent travail vise à optimiser le paramétrage de détection cellulaire des spz canins par le système HT-IVOS II et évaluer son effet sur la concentration et la mobilité « MOT%, PROG% ».

1. L'APPAREIL GENITAL MALE :

1.1. Les testicules et les voies spermatiques :

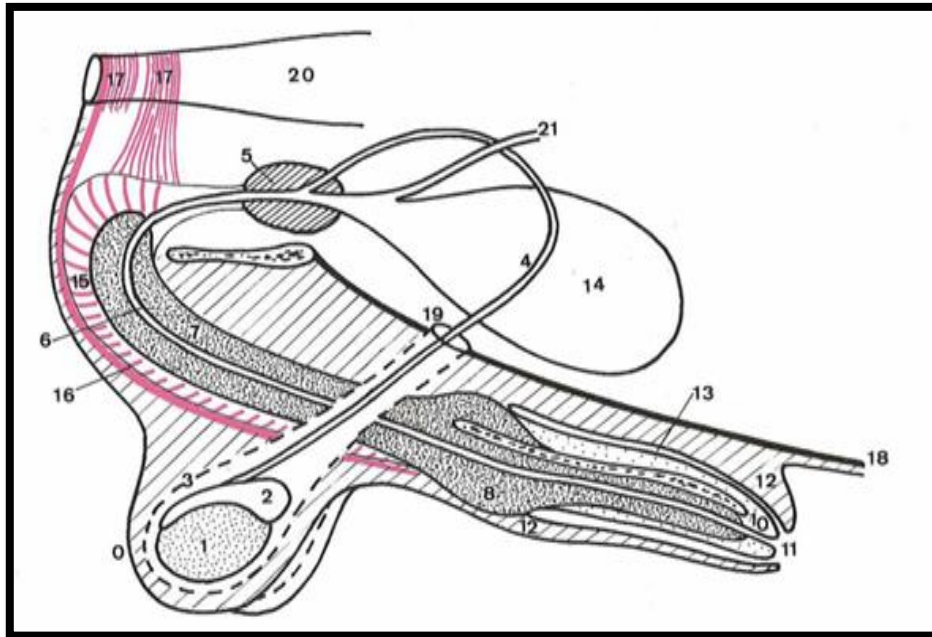
1.1.1. Rappels anatomiques (figure n°1) :

L'appareil génital du chien mâle, formé par l'ensemble des organes permettant l'élaboration et le dépôt de la semence dans les voies génitales femelles, peut être divisé en trois parties (**Barone 2001**).

- **Une partie glandulaire** composée des gonades : les testicules
- **Une partie tubulaire** composée des voies de stockage et de transport des spermatozoïdes, ou voies spermatiques :
 - L'épididyme
 - Les canaux déférents
- **Une partie uro-génitale** composée de :
 - L'urètre
 - Glandes annexes : la prostate et les glandes préputiales
 - Formations érectiles contenues dans le pénis

Les testicules sont localisés dans le scrotum, enveloppe cutanée, et le pénis est protégé par le fourreau qui se termine par le prépuce. Ces divers organes sont représentés dans la figure 1.

L'appareil génital mâle assure ainsi plusieurs fonctions : il est responsable de l'élaboration et du transport de la semence canine, mais également de l'élimination de l'urine et de la sécrétion des hormones sexuelles mâles.

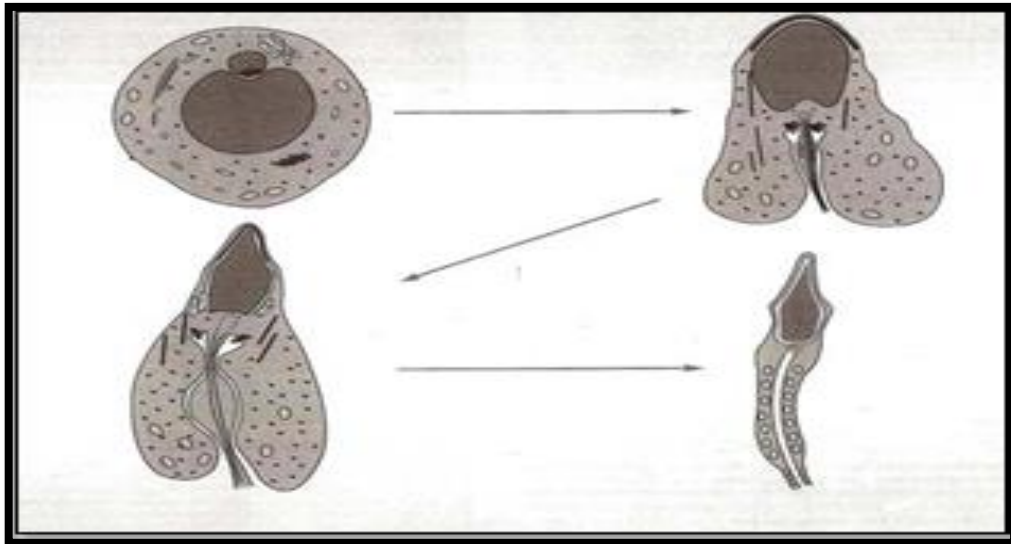


0 : Scrotum, 1 : Testicule, 2 : Epididyme, 3 : Gaine vaginale, 4 : Canal déférent, 5 : Prostate, 6 : Urètre, 7 : Tissu érectile, 8 : Bulbe érectile, 9 : Os pénien, 10 : Gland du pénis, 11 : Orifice préputial, 12 : Fourreau, 13 : Cavité préputiale, 14 : Vessie, 15 : Muscle bulbo-caverneux, 16 : Muscle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

Figure n°1 : Schéma de l'appareil génital du chien (Mialot et al1984)

1.1.2. La spermatogenèse :

La spermatogénèse est une étape primordiale dans l'élaboration de la semence par l'appareil reproducteur mâle. Il s'agit d'un processus de différenciation cellulaire ayant lieu au sein des testicules, dans les tubes séminifères, aboutissant à la formation de spermatozoïdes à partir de cellules souches. Ces cellules étant très différenciées, plusieurs étapes sont nécessaires à leur élaboration : la spermatocytogenèse ou formation des spermatides, puis la spermiogénèse qui transforme les spermatides en spermatozoïdes. Schématisé sur la figure 2.



Spermatide ronde - Spermatide en élongation-- Spermatide en élongation- Spermatozoïde

Figure n°3 : Modifications morphologiques des cellules germinales au cours de la spermiogénèse. (FONTBONNE A. (1992)).

1.1.4. Régulation de la spermatogénèse :

La régulation de la spermatogénèse est complexe, sous la dépendance du complexe hypothalamo-hypophysaire (Cunningham et Klein, 2013) :

- La **GnRH** (hormone de régulation des gonadotrophines), produite par l'hypothalamus, stimule la production de FSH (Hormone Folliculostimulante) et de LH (Hormone Lutéinisante) en agissant sur l'adénohypophyse. En effet, la GnRH est libérée de façon pulsatile, les pulsations rapides agissent sur la libération de LH et les plus lentes sur la FSH.
- La **FSH** agit directement sur les tubes séminifères en activant la production de spermatozoïdes car elle augmente la production d'ABP (Androgen Binding Protein) par les cellules de Sertoli.
- **L'ABP** va s'accumuler et former un complexe avec la **testostérone** qui permet de maintenir une concentration élevée de testostérone au sein des tubes séminifères.
- Les cellules germinales, les spermatogonies, sont sensibles à cette forte concentration de testostérone et vont entrer en spermatogénèse.
- En parallèle, la **LH** stimule la production de testostérone par les cellules de Leydig.

- La **prolactine** agit également sur les cellules de Leydig en augmentant le nombre de récepteurs à LH sur ces cellules et donc, favorise ainsi la stéroïdogénèse.

Un rétrocontrôle négatif existe également :

- La **testostérone** inhibe la synthèse de LH et de FSH au niveau de l'adénohypophyse.
- Les cellules de Sertoli produisent de **l'inhibine** (hormone androgène) qui agit sur l'hypothalamus en réduisant la libération de GnRH.
- D'autres facteurs non hormonaux participent également à la régulation :
 - La nutrition (zinc, cuivre et vitamines) est indispensable à la spermatogénèse.
 - La température des testicules doit être inférieure de deux à six degrés par rapport au reste du corps (**Cunningham et Klein, 2013**). Ceci est permis par la position pendulaire et extra-abdominale du scrotum contenant les testicules, mais aussi par la vascularisation testiculaire. Les muscles dartos et crémaster peuvent, par leur contraction, réduire ou augmenter la surface d'exposition du scrotum et rapprocher ou éloigner les testicules de l'abdomen. Enfin, la peau du scrotum étant pauvre en tissu adipeux sous-cutané et en poils, mais riche en glandes sudoripares et sébacées, elle permet également de réduire la température des testicules (**Cunningham et Klein, 2013**).

Tous ces phénomènes hormonaux sont récapitulés dans la figure 4.

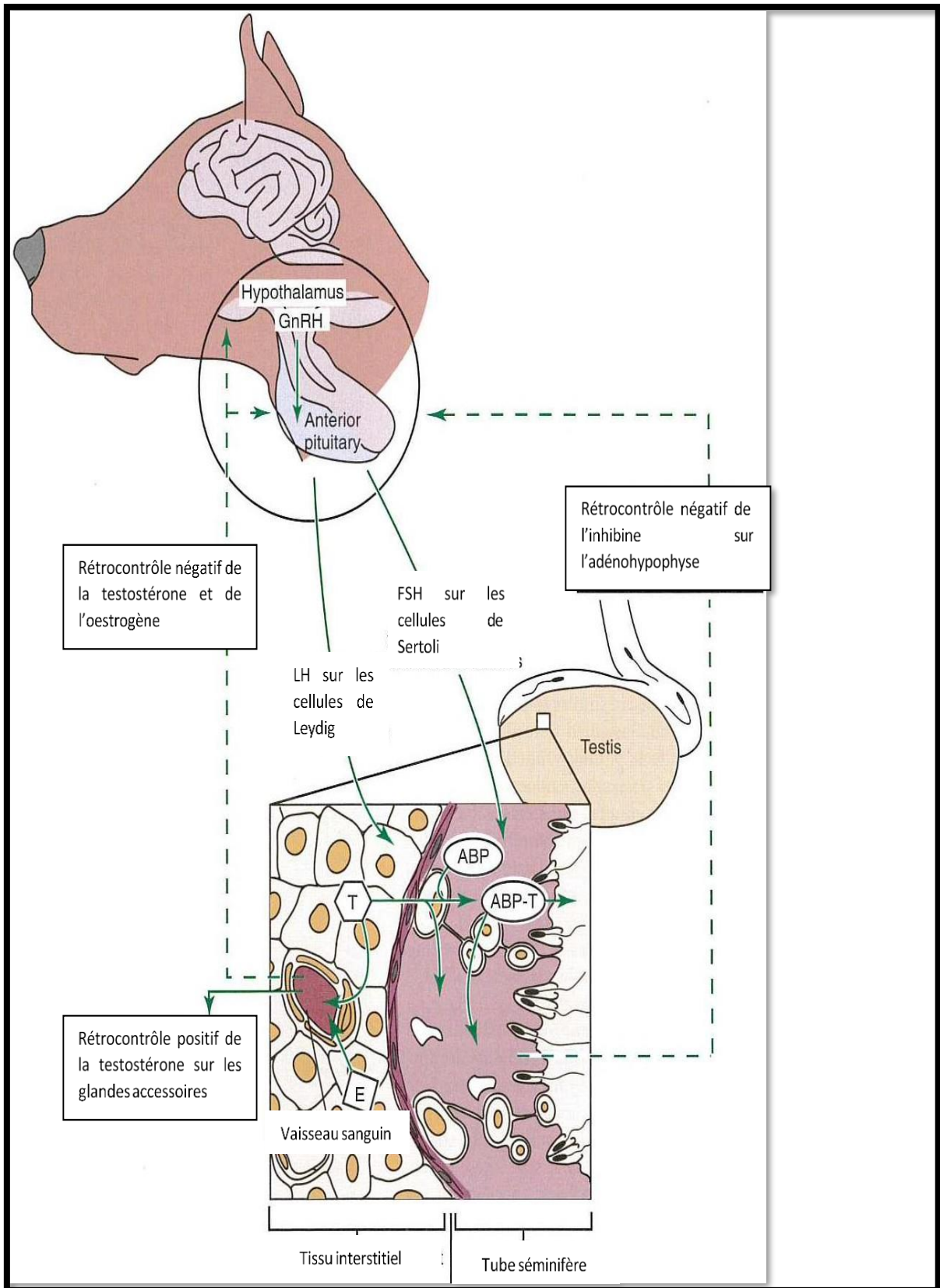


Figure 4 : Régulation de la spermatogénèse par les hormones mâles (Cunningham et Klein, 2013)

1.1.5. La maturation des spermatozoïdes : A l'issue de la spermatogénèse, les spermatozoïdes fraîchement produits ne sont encore ni féconds ni mobiles. Pour acquérir ces capacités, divers procédés ont lieu au sein de l'épididyme lors de leur transport.

1.1.5.1. La mobilité :

Elle s'acquiert progressivement, tout au long du transport du spermatozoïde dans l'épididyme. Ainsi, le pourcentage de spermatozoïdes mobiles augmente de la tête à la queue de l'épididyme. Cette traversée de l'épididyme est passive et assurée par les tubules épидидymaires.

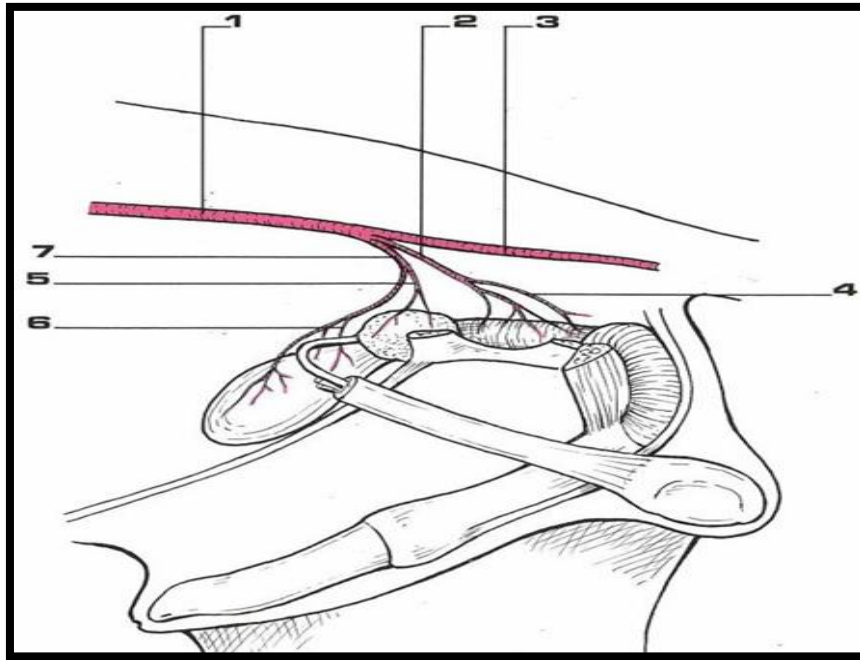
Deux types de mobilités sont à considérer :

- **La mobilité basale**, intéressant tous les mouvements du spermatozoïde, serait acquise par l'augmentation d'AMPc (Adénosyne Mono-Phosphate cyclique) intracellulaire et de protéines kinases dépendantes de l'AMPc, ainsi que d'une diminution de la concentration intracellulaire en ion calcium et en calmoduline.
- **La mobilité fléchante**, intéressant les déplacements rectilignes du spermatozoïde, qui serait acquise par augmentation intracellulaire en carnitine (**Thibault et Levasseur 2001**).

1.1.6. Les glandes annexes :

1.1.6.1. La prostate :

La prostate est la seule glande accessoire sexuelle du chien. Elle se localise entre la symphyse pelvienne et le rectum (**Piérard, 1972**). C'est un organe impair, bilobé et entourant la partie initiale de l'urètre près du col de la vessie. Sa teinte est grisâtre à jaunâtre et sa consistance ferme. Elle présente par ailleurs une symétrie axiale avec deux lobes droit et gauche séparés par un sillon médian net (Barone 2001). Chez un chien de taille moyenne, elle fait environ deux à trois centimètres de diamètre et pèse six à huit grammes. Elle est irriguée par deux artères prostatiques issues des artères honteuses internes et aussi par les artères du bulbe du pénis (dans une moindre mesure). La figure 6 montre cette vascularisation. Les veines sont satellites des artères. L'innervation de la prostate est assurée par le plexus pelvien (**Piérard, 1972**).



1. Aorte, 2. Artère iliaque interne (branche viscérale), 3. Artère iliaque interne (branche pariétale),
 4. Artère honteuse interne, 5. Artère prostatique, 6. Artère vésicale, 7. Artère uro-génitale

Figure 5 : Schéma de l'irrigation de la prostate du chien (Mialot et al., 1984).

1.1.6.2. Les glandes préputiales :

Il s'agit de glandes sébacées (également appelées glande de Tyson) localisées à la base du gland. Elles produisent des sécrétions lubrifiantes pour le gland et des phéromones odoriférantes.

1.2. Physiologie de l'accouplement :

Nous venons de voir comment étaient élaborés les spermatozoïdes, gamètes mâles du chien, dans l'appareil génital. Nous allons maintenant étudier quelques éléments de la physiologie de l'accouplement chez le chien permettant le rapprochement des gamètes mâle et femelle.

- **L'érection :**

L'érection est un phénomène réflexe initié par des stimuli sexuels appliqués sur la région génitale (et donc intégrée par la moelle osseuse) ou sur le système nerveux central (odeur, vue du partenaire sexuel) qui active le système nerveux parasympathique sacré. Celui-ci libère du monoxyde d'azote (NO) qui permet une relaxation des artères du pénis responsable d'une augmentation du débit sanguin. De plus, il agit sur les cellules musculaires du corps caverneux du pénis qui se relâchent, permettant à ce dernier de se tuméfier. Ces deux phénomènes participent à la compression des veines péniennes et réduisent donc le drainage sanguin.

Les muscles du pénis entrent également en jeu : leurs contractions, activées par le système nerveux parasympathique, propulse le sang vers la partie distale du pénis et contribuent à la rigidité pénienne nécessaire à l'intromission (**Thibault et Levasseur, 2001**).

La testostérone agit également sur l'érection en augmentant la vasodilatation pénienne et en augmentant la réponse du système nerveux central aux stimulations sexuelles (**Noakes et al, 2009**).

- **L'intromission :**

Le chien monte dorsalement et caudalement sur la femelle réceptive et immobile, il enserre son corps avec ses membres antérieurs et pénètre le vagin (préalablement positionné et lubrifié de façon optimale par la femelle) avec son pénis en érection (**Ruckebusch et al, 1991**). Le chien effectue des mouvements de poussée vigoureux de l'arrière train. Quand l'intromission est réalisée, le bulbe du gland gonfle énormément permettant ainsi un rapport très étroit entre le pénis et le vagin de la chienne. Après environ 80 secondes de coït, le chien commence à éjaculer (**Noakes et al, 2009**).

- **L'éjaculation :**

Il s'agit d'un réflexe initié par des nerfs sensitifs du gland du pénis recevant des stimuli tactiles et de pression (**Noakes et al, 2009**). La queue de l'épididyme et le canal déférent se contractent de façon séquentielle pour propulser les spermatozoïdes dans l'urètre proximal. La stimulation nerveuse sympathique permet la fermeture du col vésical et aussi la contraction de la prostate (**Vaissaire et al, 1977**).

La contraction rythmique des muscles périnéaux combinée à celle des muscles de l'urètre et du tractus génital permet l'expulsion violente et saccadée de la semence (**Thibault et Levasseur, 2001**).

- **La recation postcoïtale :**

Le chien descend de la chienne mais son pénis reste bloqué à l'intérieur du vagin à cause de la tuméfaction des bulbes du gland. Le pénis fait donc un angle de 180° par rapport à sa position initiale, comme nous pouvons le voir sur la figure 14, ce qui comprime les veines drainant le pénis et est à l'origine d'une détumescence retardée du pénis. Ce retard permet au pénis de libérer dans le vagin du liquide prostatique, flushant vers l'utérus les spermatozoïdes (**Ruckebusch et al, 1991 ; Noakes et al. 2009**).

2. La semence canine :

La semence canine est un liquide contenant les gamètes mâles (les spermatozoïdes) et les sécrétions provenant des glandes sexuelles accessoires. Ces deux éléments se mélangent lors de l'éjaculation. (**Barone 2001**).

La semence canine est éjaculée en trois fractions distinctes :

- La première est la fraction pré-spermatique ou urétrale.
- La deuxième est la fraction spermatique ou épидидymaire.
- La troisième est la fraction prostatique. (**Johnston et al 2001, Fontbonne et al 2007**)

2.1. 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 ; sa concentration en SPZ est de 60 millions de SPZ par ml en moyenne (de 20 à 110) (Vernon et al 2014). L'éjaculat du chien est composé de trois fractions présentant des caractéristiques différentes tant au niveau de leur origine que de leur composition et de leur volume (figure n°7 et tableau n°1).

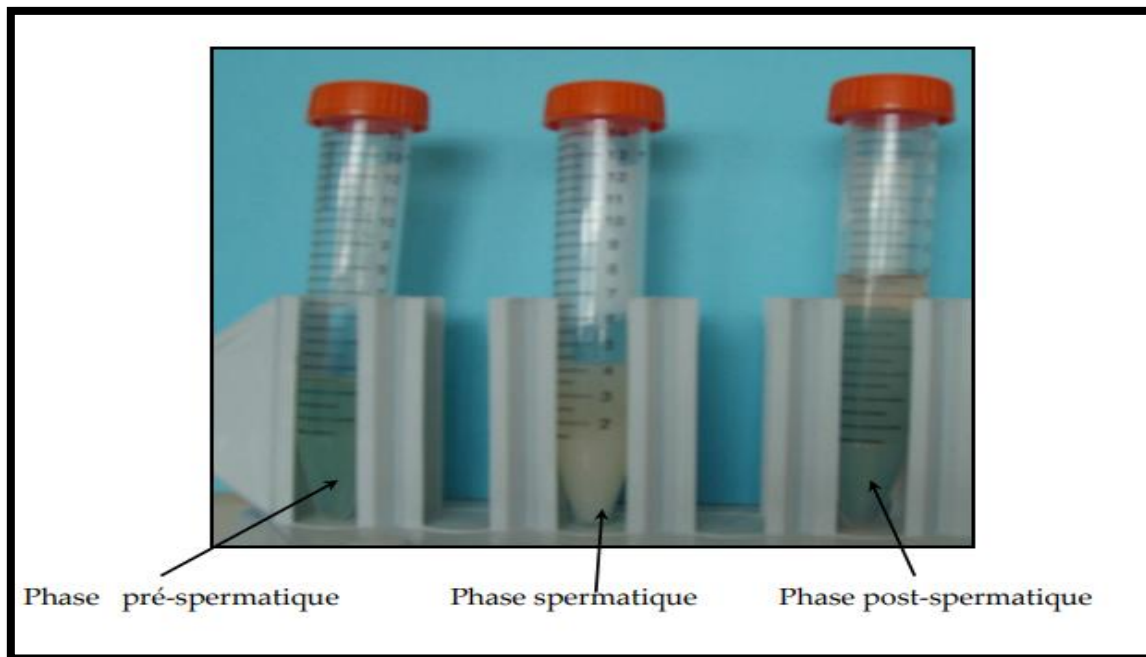


Figure n°6 : Les trois phases de l'éjaculat du chien. (FONTBONNE A, DUMONT C.1992).

Tableau n°1 : Description des trois phases de l'éjaculat du chien (FONTBONNE A., DUMONT C. 1992).

	Origine	Aspect	Volume	PH	Composition
Phase pré-spermatique	Prostatique	Blanchâtre	0.2 à 2 mL	6.2 - 6.5	-Moins de 3 millions de Spermatozoïdes. - liquide prostatique
Phase spermatique	Epididymaire	Plus ou moins laiteuse	0.5 à 3.5 mL	6.3 - 6.6	-Très riche en spermatozoïdes. - Sécrétion Epididymaire.
Phase post-spermatique	Prostatique	Clair	4 à 30 mL et plus	6.5 - 7.0	-Très rares spermatozoïdes. -Liquide prostatique.

2.2. Composition de la semence canine :

2.2.1. Le liquide séminal :

*Définition :

Le plasma séminal est le constituant le plus volumineux du sperme. Son nom est impropre étant donné que le chien ne possède pas de vésicule séminale. Par extrapolation avec les autres espèces, on utilise ce terme pour désigner le liquide dans lequel les spermatozoïdes du chien sont en suspension. Le liquide séminal est produit en grande partie par les sécrétions prostatiques (75%) et épидидymaires (25%). Il sert de milieu tampon et de soutien nutritif pour les spermatozoïdes jusqu'à leur dépôt dans les voies génitales femelles.

*Composition :

Le liquide séminal contient :

- **Des glucides** : ils correspondent au substrat énergétique nécessaire aux spermatozoïdes. Parmi eux, on retrouve du fructose (présent en faible quantité chez le chien en raison de l'absence de vésicule séminale), du glucose, du sorbitol et de l'inositol.
- **Des lipides** : ils sont principalement synthétisés par la prostate. Ils forment des corps amylicés.
- **Des protéines et acides aminés** : ils proviennent du plasma sanguin (albumine, globulines, transferrine, glycoprotéines et immunoglobulines) ou sont synthétisés par la prostate (certaines immunoglobulines). L'albumine et les globulines ont un rôle de maintien de l'équilibre osmotique qui est très important pour la survie des spermatozoïdes. On retrouve de nombreuses enzymes comme la phosphatase alcaline. On retrouve aussi l'acide citrique, synthétisé par la prostate, qui maintient la pression osmotique en association avec le potassium.
- **Des ions et des électrolytes** : ils permettent de maintenir l'iso-tonicité du liquide. Le calcium est nécessaire au bon fonctionnement des spermatozoïdes. Le potassium et le magnésium favorisent la viabilité du sperme. Le zinc aurait un rôle bactériostatique, il est sécrété par la prostate. On retrouve aussi du fer, du sodium, du chlorure et des phosphates.
- Des vitamines
- Des hormones : stéroïdes (exemple : testostérone) ou protéiques (exemple : prolactine).

***Rôles :**

Le rôle majeur de ce liquide est l'apport de substrats énergétiques aux spermatozoïdes. En effet, les spermatozoïdes n'ont pas d'apport énergétique dans l'épididyme. La dilution des gamètes dans le plasma séminal permet aussi un meilleur transfert des spermatozoïdes dans les voies génitales femelles. Le liquide séminal remplit aussi une fonction bactériostatique permettant de protéger les gamètes contre la flore génitale de la femelle.

Toutefois, l'importance du plasma séminal est discutable : en effet, il n'y a pas de différence entre les taux de fécondation obtenus avec des spermatozoïdes prélevés dans la queue de l'épididyme ou avec des spermatozoïdes éjaculés. De surcroît, certaines protéines du liquide séminal tapissent le spermatozoïde et permettent de prévenir une capacitation trop précoce du gamète. Ces protéines doivent donc être éliminées avant d'atteindre l'ovocyte car elles bloquent le pouvoir fécondant du spermatozoïde. (Fontbonne et al 2007),(Zeleznik et Knobil 2015), (Schatten et al 2007).

2.2.2. Le spermatozoïde :

***Définition :**

Le gamète mâle appelé spermatozoïde est une cellule reproductrice hautement différenciée et spécialisée dans la fécondation. Le spermatozoïde est haploïde (1 chromosome à 1 chromatide pour chaque paire de chromosomes). Sa taille est d'environ 50-70 µm et il a une forme de petite poire de face et d'une flamme de bougie de profil. Le spermatozoïde est constitué de 3 parties (Figure 7), recouvert par la membrane plasmique en totalité :

-La tête.

-Le cou (ou col).

-Le flagelle, lui-même constitué de 3 parties : pièce intermédiaire, pièce principale et pièce terminale.

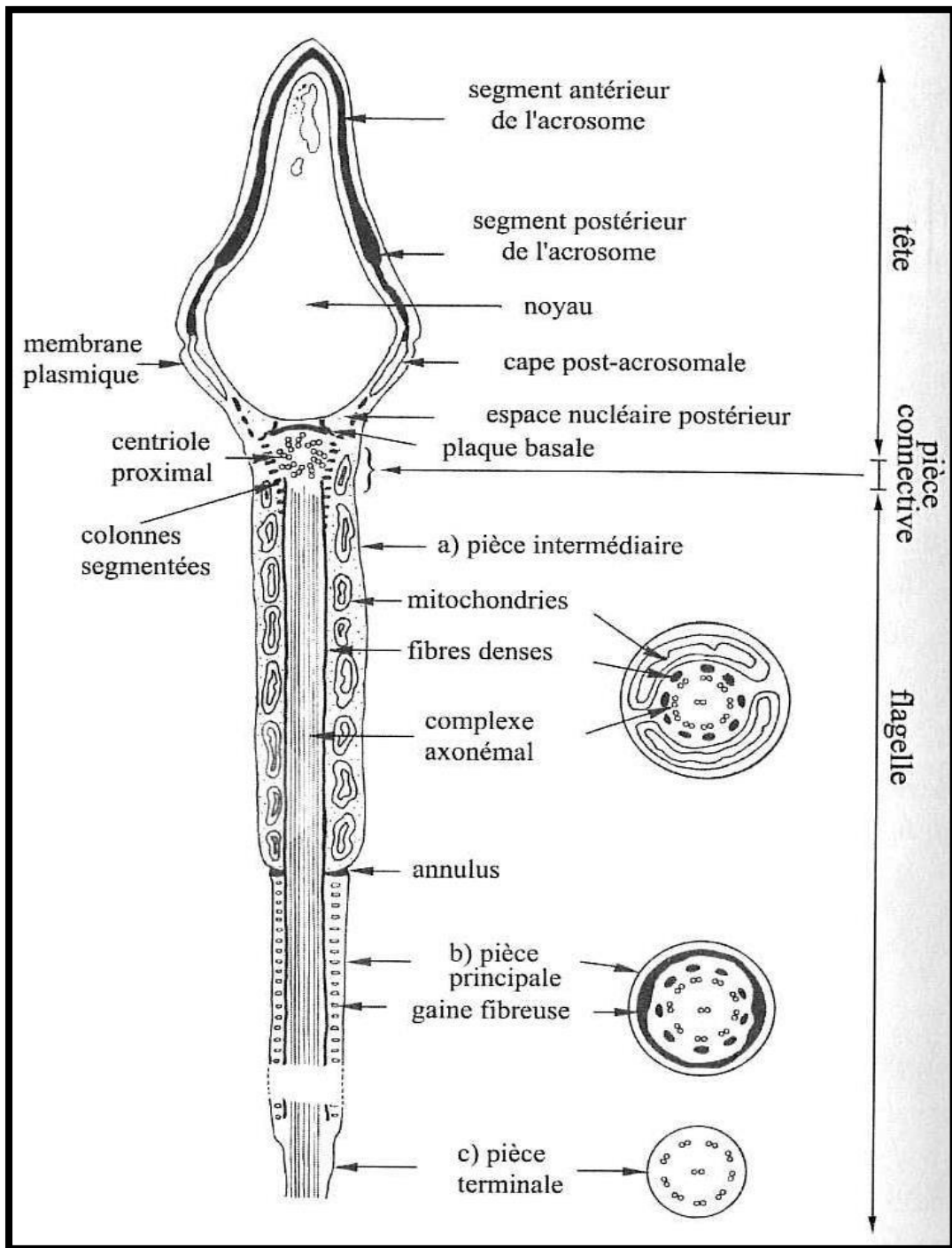


Figure 7 : Schéma d'une coupe longitudinale d'un spermatozoïde ; trois niveaux du flagelle sont représentés en coupe transversale (Thibault et Levasseur, 2001)

2.2.3. Description du spermatozoïde :

*La tête :

La tête du spermatozoïde est la région la plus antérieure du spermatozoïde. Elle contient trois organites principaux : le noyau, la thèque périnucléaire et l'acrosome. Cette portion du spermatozoïde est piriforme, aplatie dans l'axe antéro-postérieur. Elle mesure entre 4 et 5 μm . Ses principales fonctions sont la pénétration dans l'ovocyte, l'apport d'un génome haploïde contenu dans le noyau et l'initiation du développement embryonnaire. (Zeleznik AJ, Knobil 2015)(Fontbonne et al 2007)(Schatten H et al 2007). Le noyau haploïde possède une chromatine très condensée, ce qui permet de protéger le génome du spermatozoïde lors de son long transit, d'abord dans le tractus génital masculin puis dans le tractus génital féminin. La tête renferme également l'acrosome : il s'agit d'une grande vésicule dérivant de l'appareil de Golgi contenant de nombreux enzymes et constitue une sorte de coiffe au niveau de la partie antérieure du noyau spermatique. Cet acrosome a un rôle fondamental lors de la fécondation par la libération de son contenu enzymatique permettant la lyse de la zone pellucide de l'ovocyte et l'apparition ou la modification de récepteurs et protéines jouant un rôle dans la fixation et la fusion avec l'ovocyte : ce phénomène s'appelle la réaction acrosomique.

*Le flagelle :

Le flagelle est constitué de fibres et de microtubules, c'est l'élément moteur du spermatozoïde puisqu'il lui permet d'avoir une mobilité indispensable pour sa rencontre avec l'ovocyte. Il est constitué de 3 parties : pièce intermédiaire (4-5 μm), pièce principale (45-50 μm) et pièce terminale (1-2 μm). La structure du flagelle est organisée autour de l'axonème avec la présence de structures péri-axonémales (sauf au niveau de la pièce terminale).

L'axonème est formé au centre des colonnes segmentées à partir du centriole distal. Il s'agit d'une structure constituée de microtubules organisés avec 9 doublets de microtubules périphériques (microtubules A et B) reliés entre eux par des ponts de nexine et 1 doublet central entouré d'une gaine, relié par des fibres radiaires aux doublets périphériques. Les microtubules A sont dits « complets » et sont composés de 13 sous unités tubuline alors que les microtubules sont dits « incomplets » et sont composés de 9 sous unités tubuline. Des bras internes et externes de dynéine sont associés au microtubule A et peuvent lier un microtubule A au microtubule B du doublet voisin : il s'agit d'ATPase et ont donc un rôle moteur.

Les différentes structures péri-axonémales sont :

Manchon mitochondrial ou gaine de mitochondries : la pièce intermédiaire contient une zone riche en mitochondries suite à leur migration lors de la spermiogénèse. Ces mitochondries sont indispensables à la mobilité du spermatozoïde car elles apportent l'énergie nécessaire à la mobilité du flagelle grâce à l'hydrolyse de l'ATP.

Fibres denses : elles prolongent les colonnes segmentées et correspondent à des densifications protéiques en regard des doublets périphériques. Elles sont présentes dans la pièce intermédiaire et la pièce principale.

Gaine fibreuse : elle n'est présente que dans la pièce principale.

Colonnes longitudinales : correspondent à un épaississement de la gaine fibreuse se confondant avec les fibres denses en regard des microtubules 3 et 8 (plan du doublet central). (Zeleznik AJ, Knobil 2015),(Fontbonne et al 2007),(Schatten H et al 2007).

La pièce terminale du flagelle quant à elle ne contient pas de structures péri-axonémales.

***La membrane cytoplasmique :**

La membrane plasmique joue d'importants rôles dans la fonction du spermatozoïde, notamment lors de la capacitation, de la réaction acrosomique et dans la fusion avec la zone pellucide de l'ovocyte. Elle subit d'importants changements pendant la maturation des spermatozoïdes. C'est une membrane hautement spécialisée. En effet, la surface du spermatozoïde est organisée en plusieurs domaines composés d'une panoplie unique de lipides et de protéines en lien avec une fonction précise liée à leur localisation.

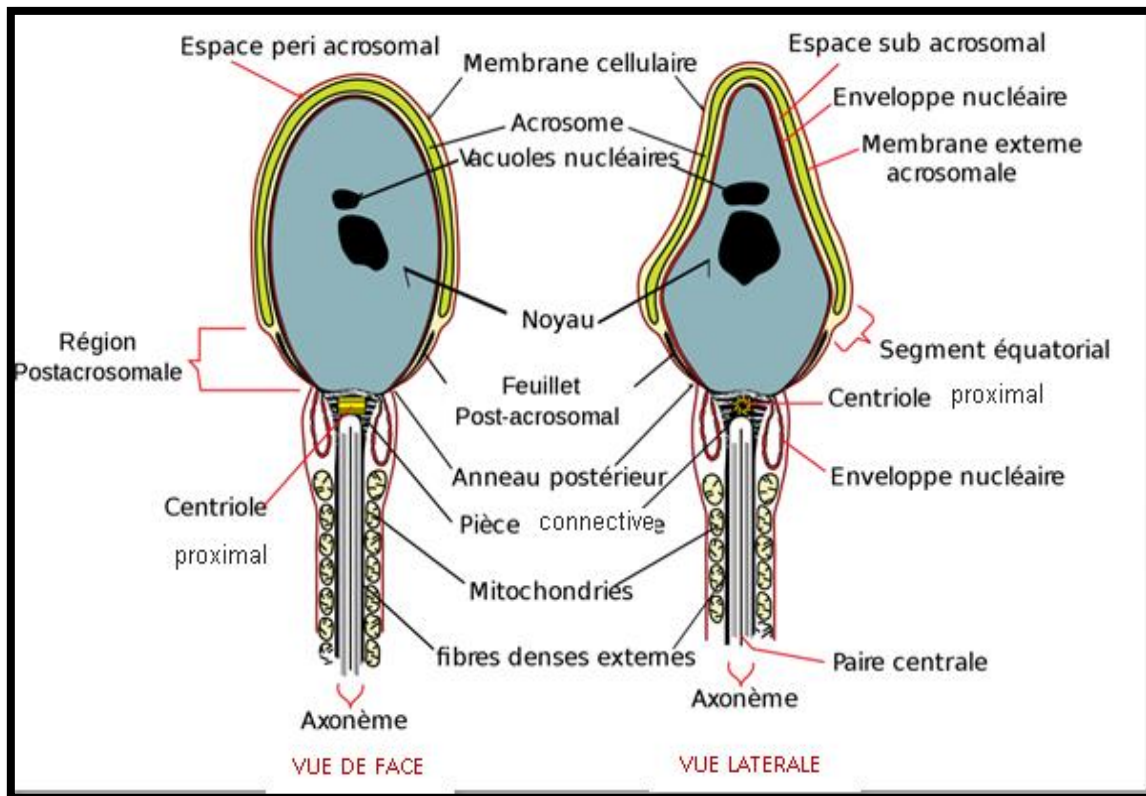


Figure n°8 : Schéma du spermatozoïde de mammifère.

2.2.4. Capacitation et fécondation :

La capacitation correspond à la transformation du spermatozoïde le rendant apte à reconnaître la zone pellucide de l'ovocyte et de s'y fixer. Lors de la capacitation, de nombreuses modifications de la membrane plasmique ont lieu :

- Une redistribution phospholipidique et protéique permet de découvrir les récepteurs spermatiques (galactosyltransférase) assurant la fixation à la protéine ZP-3 présente sur la zone pellucide de l'ovocyte.
- Le cholestérol libre présent à la surface membranaire disparaît. Cela augmente la perméabilité de la cellule et provoque un influx calcique. Il en découle une cellule hypermotile capable de traverser le cumulus oophorus et d'atteindre l'ovocyte.

Après la capacitation, la fertiline est clivée et redistribuée en région post-acrosomale. Cette protéine est responsable de la fusion des gamètes.

À la suite de la capacitation a lieu la réaction acrosomique, au court de laquelle a lieu d'autres modifications membranaires :

- La liaison entre la protéine membranaire reconnaissant la protéine ZP-3 et la zone pellucide est à l'origine d'un efflux de calcium qui provoque l'exocytose du contenu acrosomal.
- La membrane plasmique se fenêtré puis fusionne avec la membrane acrosomale externe.
- Dans le même temps, la libération de hyaluronidases facilite l'accès du spermatozoïde dans la zone pellucide.
- Les protéines membranaires telles que celle reconnaissant la ZP-2 localisées sur la membrane acrosomiale interne se fixent alors à la zone pellucide, créant ainsi une liaison supplémentaire entre l'ovocyte et le spermatozoïde.

Enfin, lors de la fusion, des protéines possédants deux domaines d'activité (un servant à la fixation et un présentant une activité protéase) permettent la reconnaissance et la fusion des membranes plasmiques du spermatozoïde et de l'ovocyte. Une de ces protéines est la fertiline, elle est localisée en région post-acrosomique là où débute la fusion avec l'ovocyte. La fusion déclenche alors l'exocytose des granules corticaux situés sous la membrane plasmique de l'œuf. **(Thibaut et Levasseur 2001), (Zeleznik et Knobil 2015) (Fontbonne et al, 2007), (Schatten et al, 2007).**

2.3. Facteurs de variation des caractéristiques de la semence canine :

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 totaux 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, 1998). De plus, après la puberté, la première éjaculation contient souvent un nombre important de spermatozoïdes anormaux ou morts. **(Feldman et Nelson 1996).**

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 1996) ; (FONTBONNE et DUMONT C.,1992).**

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.

Ainsi, la concentration est la plus importante à la fin du printemps et au début de l'été et est la plus basse à la fin de l'été et au début de l'automne. De plus, il y a une augmentation des formes anormales pendant l'été. **(Feldman, Nelson 1996, Johnston et al 2001).**

La taille de la prostate a une influence sur le volume de l'éjaculat qui est proportionnel à la taille de celle-ci. 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. **(Johnston et al 2001).**

2.3.1. Récolte de la semence canine :

2.3.1.1. Objectifs de la récolte de sperme :

Le prélèvement de semence chez le chien présente plusieurs indications :

- Le refus de l'accouplement par le mâle ou la femelle. Il est le plus souvent dû au stress, au mauvais choix de la date fixée par les propriétaires des animaux (chienne en pro- œstrus ou en metœstrus) ou d'une mauvaise socialisation interspécifique. Parfois, des anomalies congénitales ou des pathologies génitales peuvent aussi en être à l'origine.
- L'éloignement géographique de deux reproducteurs.
- La protection des animaux reproducteurs contre les affections à transmission vénérienne.
- La conservation du sperme par réfrigération ou congélation.
- Le diagnostic d'une atteinte de l'appareil génital mâle dans le but de réaliser un spermogramme. **(Dumon C., 2007) (Kutzler M.A., 2005)**

2.3.1.2. Méthodes de récolte du sperme :

Les sources de sperme peuvent provenir de l'épididyme, dans certains cas du testicule mais le plus souvent d'un éjaculat. **(Veyer E 2002)** Plusieurs méthodes de récoltes sont disponibles.

a- La récolte par stimulation manuelle :

Il s'agit de la méthode la plus couramment utilisée. La récolte par stimulation manuelle débute par un massage vigoureux du pénis, du prépuce jusqu'au bulbe érectile, jusqu'à ce qu'une érection partielle soit perceptible. Cette étape n'est toutefois pas toujours nécessaire.

Le pénis est rapidement décalotté (retrait du prépuce vers l'arrière) et une pression ferme et constante est appliquée en arrière du bulbe érectile, entre le pouce et l'index. Il n'est plus nécessaire à ce stade de masser le pénis d'avant en arrière, ceci pouvant même conduire à une perte d'érection. **(Linde-Forsberg., 1991).**

Des mouvements saccadés du bassin peuvent être observés à ce stade, jusqu'à l'érection complète.

Il arrive que le chien souhaite se retourner (moment d'attachement à la chienne en conditions naturelles) et le pénis est alors tourné à 180° dans le plan horizontal (partie dorsale du pénis reste dorsale). Le collecteur doit conserver une pression constante au-dessus du bulbe érectile tout en tirant doucement le pénis caudalement.

L'éjaculation qui suit est composée des 3 fractions. La semence riche en sperme est éjaculée en un temps inférieur à 2 minutes. La récolte de la 3^e fraction est nécessaire en cas d'analyse de la semence. (**Linde-Forsberg 1991**). Des contenants différents sont utilisés pour récolter chacune des fractions. Idéalement, cette méthode est pratiquée en présence d'une femelle en œstrus, mais cela n'est pas nécessaire. Il faut veiller à éliminer tout environnement qui pourrait créer du stress, de l'anxiété. Il est également important de noter que la douleur et la peur inhibent le mâle et l'empêchent d'atteindre une éjaculation complète. (**Linde-Forsberg 1991**).

b- Méthodes alternatives de récolte de la semence :

➤ Par électroéjaculation :

Cette méthode de prélèvement de la semence consiste à placer une électrode dans le rectum de l'animal afin de stimuler le nerf pudendal (ou nerf honteux), situé en regard de la prostate, par une sollicitation électrique.

Cette technique est rarement utilisée chez le chien, mais reste plus répandue lors de récolte de sperme de bovins.

➤ Méthode pharmacologique :

Il existe aussi une méthode pharmacologique qui consiste en l'injection sous-cutanée d'une molécule à action parasymphomimétique, la pilocarpine. Cette substance est extraite d'une plante de la famille des Rutacées. L'éjaculation est observée dans les 30 minutes après l'injection.

Cette méthode présente cependant des effets secondaires généraux comme l'hypersécrétion lacrymale et salivaire, mais aussi sur l'éjaculat en altérant sa quantité et sa qualité. Il s'agit d'une méthode qui n'est plus utilisée à l'heure actuelle.

La motilité du sperme obtenue par les méthodes d'électroéjaculation ou par la méthode pharmacologique est significativement plus faible que lors de la manipulation manuelle. (Linde-Forsberg., 1991).

2.3.1.3. Matériel nécessaire :

Le matériel nécessaire à la récolte manuelle se compose de :

- Trois tubes stériles (un pour chaque fraction de l'éjaculat).
- Un cône en caoutchouc dont la taille est adapté à celle du chien.

Les tubes seront montés sur le cône en caoutchouc (comme on peut le voir sur la figure n°7) et changés successivement lorsqu'une nouvelle fraction de l'éjaculat est émise.

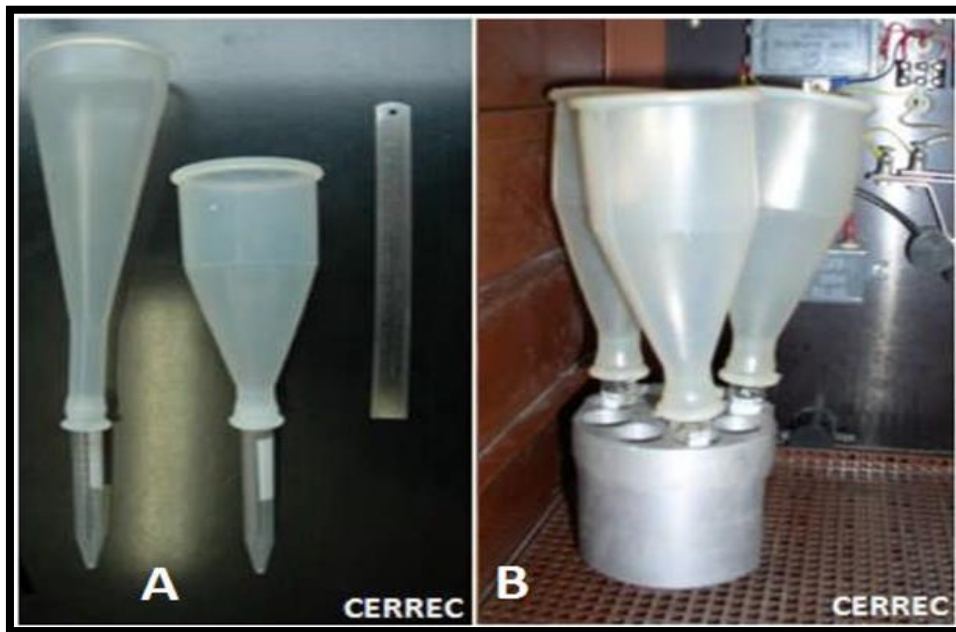


Figure n°9 a : Matériel de récolte manuelle de la semence canine

Ces instruments doivent être préalablement conservés dans une étuve chauffée à 37°C, telle que celle qui est visible sur la photographie 2, pour éviter aux spermatozoïdes récoltés de subir un choc thermique et également pour ne pas perturber l'éjaculation du chien.



Figure n° 9 b : Etuve contenant les cônes en caoutchouc et les tubes stériles à 37°C.

Le nettoyage des cônes doit être effectué avec soin. Les cônes doivent être abondamment rincés car les détergents sont pour la plupart spermicides.

2.3.1.4. Environnement de la récolte :

Le stress est un facteur fortement négatif sur la qualité du sperme ; le chien donneur doit donc être placé dans une pièce calme et confortable, avec un nombre minimal de personnes.

2.3.1.4.1. Mise en condition du chien :

La présence d'une chienne en chaleur est conseillée car elle augmente l'excitation du chien et donc la qualité du sperme récolté. Il est indiqué de placer celle-ci dans une position mimant le comportement naturel, c'est-à-dire de placer la chienne devant le mâle, debout en lui levant la queue pour que sa vulve soit visible par le mâle. Si la chienne n'est pas coopérative, une muselière peut être utilisée. Bien que conseillée, la présence d'une chienne en chaleur n'est pas toujours nécessaire, notamment pour des mâles « entraînés ». De plus, il est possible de faire renifler au mâle un coton imbibé de sécrétions vaginales de chienne pour stimuler sa libido.

2.3.4.1.2. Stimulation digitale :

Un assistant assure la contention de la femelle boute-en-train, en maintenant sa queue sur le côté. La femelle doit être muselée s'il y a un risque de morsure. Le mâle est emmené derrière la chienne. Tandis que le chien renifle le périnée et la vulve de la femelle, l'opérateur

s'agenouille du côté gauche du mâle (si l'opérateur est droitier). Le pénis du chien est massé vigoureusement en arrière des bulbes érectiles avec la main droite. La main gauche de l'opérateur apporte le cône en caoutchouc (sur lequel est fixé le premier tube stérile) au niveau du prépuce. Lorsque le pénis du chien atteint 50% de son érection, le prépuce est repoussé derrière les bulbes érectiles avec le vagin artificiel. Une pression circulaire et ferme doit être maintenue avec la main gauche. A ce moment, le prépuce est repoussé vers l'arrière et le pénis est en érection et extériorisé : la main maintient donc une pression sur le pénis extériorisé. Une troisième personne change les tubes stériles pour la récolte des différentes fractions du sperme. Le chien va présenter des mouvements vigoureux de bassin en avant et en arrière. Le chien peut essayer de se retourner en soulevant son membre postérieur. Le manipulateur peut alors récliner le pénis vers l'arrière. L'émission des deux premières phases se déroule alors. La troisième phase est émise : elle est parfois trop abondante, on ne la récupère pas toujours entièrement. Les trois tubes contenant la semence sont immédiatement placés dans un bain marie à 37°C.

Après la récolte de la dernière phase, le chien peut encore éjaculer des sécrétions prostatiques quelques temps. Il faut s'assurer que la rétractation du pénis soit totale avant de mettre le chien en présence d'autres animaux ou de l'isoler dans un kennel. De même, il faut éviter l'introduction de poils entre le pénis et l'orifice préputial qui peut être douloureuse pour l'animal lors de la rétractation du pénis. **(Johnston et al 2001),(Dumon C 2007)(Kutzler MA 2005),(Fontbonne A et al 2007) ;(Joni L. Freshman 2002).**



Figure n°10 a : début de la récolte. La tête du chien est maintenue par le propriétaire et orientée vers l'arrière train de la femelle. Massage en arrière des bulbes, retrait du fourreau et application d'une pression en arrière des bulbes. (FONTBONNE A, DUMONT C. 1992).



Figure n°10 b : soulèvement d'un postérieur. (FONTBONNE A., DUMONT C. 1992).

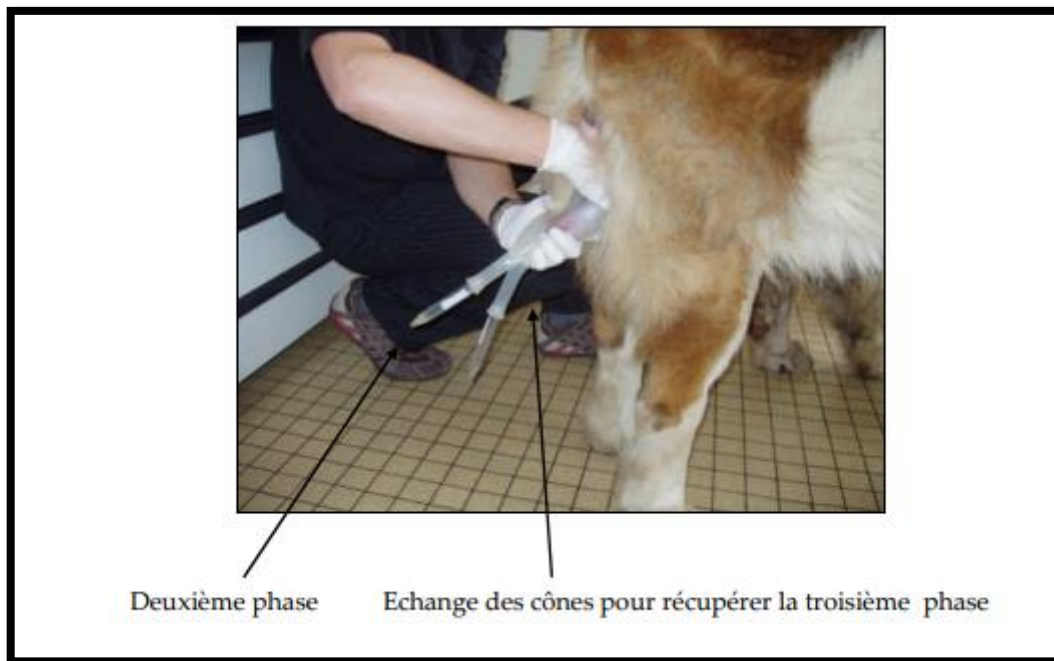


Figure n°10 c : orientation caudale du pénis. (FONTBONNE A, DUMONT C. 1992).

Après la récolte, le chien est promené plusieurs minutes afin de faciliter le recalottage du pénis dans le fourreau. Avant le départ du chien, il est important de vérifier que le pénis est entièrement recouvert par le prépuce et qu'il n'y a pas de poils coincés dans l'orifice préputial ni d'éversion de la membrane préputiale (FONTBONNE A. (1995).

3. Evaluation de la semence canine :

3.1. Les examens utilisés en routine :

L'examen de la semence doit être systématique et cela peu importe l'emploi auquel on la destine. En effet, il semble évident d'examiner la semence d'un chien ayant des problèmes de fertilité, mais il faut également faire cet examen pour éviter de congeler, réfrigérer ou inséminer une chienne avec une semence de mauvaise qualité. L'examen doit être réalisé juste après la récolte en plaçant le sperme à 37°C pour lui éviter un choc thermique (Blonz O ; 1989).

3.1.1. Examens macroscopiques :

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

3.1.1.1. Le volume :

Les tubes stériles de prélèvement peuvent être gradués, ce qui permet une lecture rapide du volume d'éjaculat récolté. Comme nous l'avons vu précédemment, le volume de l'éjaculat est très variable en fonction de l'animal, de son âge, son statut physiologique, la saison, la technique, la fréquence des récoltes etc... La fraction spermatique varie de 0,5 à deux millilitres ; on peut donc d'emblée constater des anomalies du volume de l'éjaculat résumées dans le tableau 2.

Tableau 2 : Anomalies du volume de l'éjaculat (Guigardet V., 1997).

Anomalie	Description	Etiologie
Aspermie	Absence de sperme	Ejaculation rétrograde causée par : <ul style="list-style-type: none">- Anomalies congénitales (agénésie des canaux déférents)- Anomalies acquises (obstruction des conduits génitaux, épидидymite, urétrite, orchite)
Oligospermie	Diminution du volume de l'éjaculat	<ul style="list-style-type: none">- Ejaculation rétrograde- Traitement anti-androgénique contre l'hyperplasie bénigne de la prostate avec des progestatifs à effets anti-androgène

3.1.1.2. L'aspect :

L'opacité visuelle de l'éjaculat traduit sa concentration en spermatozoïdes : plus le sperme est opaque et plus il est concentré, plus il est transparent et plus il sera pauvre en spermatozoïdes.

La couleur doit être blanchâtre à jaunâtre, comme nous l'avons vu précédemment. Une modification de couleur indiquera une anomalie du sperme qui peut éventuellement être responsable d'une baisse de fertilité. Les modifications de couleur sont rapportées dans le tableau 3.

Tableau 3 : Modification de la couleur de la semence canine (Delay J. 2014).

Couleur, aspect	Etiologie
Jaune	Présence d'urine (urospermie) Présence de pus (pyospermie)
Rosée à rouge	Hémospemie
Brun	Présence d'éléments sanguins dégénérés
Bleu	Faible concentration en spermatozoïdes
Opaque	Dégénérescence testiculaire

3.1.1.3. L'odeur :

L'odeur du sperme donne peu d'indication. Normalement, il doit être inodore. La présence d'une odeur anormale peut évoquer une contamination de l'éjaculat par de l'urine, du pus ou des bactéries. (Oettle E. 1986).

3.1.1.4. Le pH :

Le pH physiologique du sperme canin variait de 6,3 à 6,7. Ce paramètre est d'autant plus important à évaluer qu'une alcalinisation de l'éjaculat entraîne une baisse de la mobilité des spermatozoïdes et donc une baisse de la fertilité (Johnston et al 2001). De plus, une modification du pH du sperme peut traduire une inflammation des testicules, de l'épididyme ou de la prostate qu'il faudra traiter.

3.1.2. Examens Microscopiques :

3.1.2.1. La mobilité :

Elle doit être évaluée le plus rapidement possible après la récolte et en plaçant le sperme à 37°C pendant l'examen (une perte de mobilité pourrait être due à un refroidissement des spermatozoïdes). Pour se faire, on utilise un microscope à platine chauffante, comme celui qui est présenté dans la photographie 3.



Figure n°11 : Microscope à platine chauffante

Cet examen intéresse deux types de mobilité :

- a- La mobilité massale :** on place une goutte de sperme sur une lame maintenue à 37°C par la platine chauffante du microscope et on observe au grossissement X100 les mouvements de l'ensemble des spermatozoïdes. On attribue alors une note de zéro à cinq à l'éjaculat en fonction des résultats de l'observation notés dans le tableau 4. La note étant attribuée de façon subjective, on limite les biais en employant toujours le même opérateur pour évaluer cette mobilité. Un sperme est de bonne qualité si sa note est au moins égale à quatre.

Tableau 4 : Echelle d'appréciation de la mobilité massale de la semence canine, dérivée de l'échelle de Milovanov (**Guigardet V. 1997**).

Note	Interprétation
0	Pas de mouvements, spermatozoïdes morts
1	Absences de mouvements d'ensemble mais faible mobilité individuelle des spermatozoïdes
2	Ebauche de mouvements d'ensemble circulaires
3	Mouvements d'ensemble : cercles centrés sur eux-mêmes
4	Mouvements d'ensemble : vagues rondes en mouvement
5	Mouvements d'ensemble intensifiés avec déplacements fléchant

b- La mobilité individuelle : elle est également évaluée de façon subjective, et donc de préférence par le même opérateur, au microscope au fort grossissement X400. Une goutte de sperme est placée entre lame et lamelle et peut éventuellement être diluée (avec du liquide prostatique, un dilueur adapté comme de l'EasyBuffer®, du lait etc...) si la concentration en spermatozoïdes est trop importante et nuit à l'observation. Il s'agit alors de déterminer le pourcentage de spermatozoïdes possédant une mobilité fléchante (mouvements rectilignes rapides). Une semence sera de bonne qualité si sa mobilité individuelle atteint au moins 70%.

3.1.2.2. La concentration :

La concentration représente le nombre de spermatozoïdes par millimètre cube ou par millilitre. Elle peut être déterminée par différentes méthodes :

- a- Méthode automatique :** au spectrophotomètre : le spectrophotomètre évalue la densité optique de l'éjaculat et détermine sa concentration par corrélation. Ce type de machine est plutôt réservé aux banques de semences.
- b- Méthode de comptage manuel :** à l'aide d'une cellule hématimétrique : on commence par diluer la semence avec du chlorure de sodium à trois pourcents pour tuer les spermatozoïdes et les rendre immobiles. On place alors une goutte de sperme dilué dans une cellule de Thoma ou de Malassez qui va être lue au microscope. On compte le nombre de spermatozoïdes dans cinq des carrés de la cellule (qui en a seize au total) puis on applique la formule suivante pour déterminer à 10% près la concentration en spermatozoïdes de l'éjaculat (**Oettle E., 1986**); (**Dumon C., 2005**) :

$$N = 50\,000 \times V \times n \times (1/d)$$

N : nombre de spermatozoïdes en millions n : nombre de spermatozoïdes comptés

V : volume de la fraction spermatique d : dilution

La concentration moyenne est de l'ordre de 400 millions de spermatozoïdes par millilitre.

La cellule de Neubauer modifiée qui fournit des résultats reproductibles peut aussi être utilisée.

L'OMS recommande la cellule de Neubauer modifiée, la cellule de Malassez qui fournit des résultats reproductibles peut aussi être utilisée.

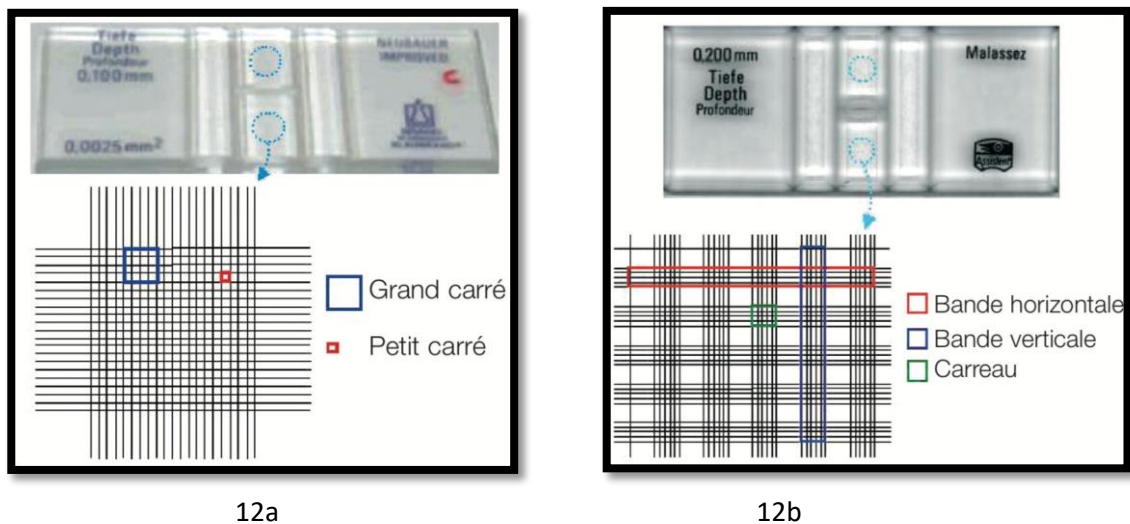


Figure n°12 : (12a) Cellule de Neubauer modifiée et son quadrillage - (12b) Cellule de Malassez et son quadrillage (Source : Bioforma 2009).

Le principe d'évaluation de la concentration reste le même pour les deux cellules. Dans un premier temps, une dilution du sperme à analyser est préalablement réalisée avec une solution formolée permettant l'immobilisation des spermatozoïdes pour faciliter leur comptage. Cette dilution est déterminée en fonction de la concentration estimée lors de l'évaluation microscopique initiale.

Deux aliquots sont réalisés dans les mêmes conditions selon la dilution adéquate permettant la réalisation de 2 comptages sur les 2 quadrillages d'une même cellule de comptage.

A condition que l'ensemble de la chambre indique une répartition relativement homogène des spermatozoïdes, les spermatozoïdes sont alors comptés en utilisant l'objectif x40 en contraste de phase et seuls les spermatozoïdes entiers sont comptés. Selon la concentration, les spermatozoïdes sont comptés sur une surface plus ou moins importante de la chambre de comptage. Ensuite, la concentration est calculée à partir du compte de spermatozoïdes, de la dilution et d'un facteur de conversion dépendant de la surface où les spermatozoïdes ont été comptés.

L'OMS fournit des valeurs acceptables de somme et de différence entre les 2 comptages et si ces valeurs sont acceptables, la moyenne des 2 comptages permet d'obtenir la concentration de spermatozoïdes.

3.1.2.3. La vitalité :

Pour tester la viabilité des spermatozoïdes, on utilise la coloration Éosine-Nigrosine, coloration standard, qui différencie les cellules mortes (prenant une coloration rouge par pénétration d'éosine à travers la membrane plasmique défectueuse) et les cellules vivantes (non colorées et restant transparentes puisque n'ayant pas laissé pénétrer l'éosine). La nigrosine est utilisée comme colorant de contraste (et souligne le contour des cellules vivantes en vert) (**Daub L, 2016**). La semence est qualifiée de « bonne » si moins de 30% des spermatozoïdes sont morts.

3.1.3. Le test hypo-osmotique :

a- Principe :

Le test hypo-osmotique est quant à lui basé sur le fait que la membrane de la cellule intacte est semi-perméable. En conséquence, si le spermatozoïde est placé en milieu hypo- osmotique, il se produit un influx d'eau, le spermatozoïde "gonfle" et le signe le plus manifeste de son augmentation de volume est un enroulement assez serré de son flagelle sur une portion plus ou moins longue de celui-ci. Au contraire, si la cellule est morte, sa morphologie ne se modifie pas.

b- Méthode : On place les spermatozoïdes dans une solution hypo-osmotique et on évalue si leur membrane plasmique est capable d'assurer son rôle de barrière osmotique. En effet, la différence de pression osmotique entre les compartiments extra et intra cellulaire va engendrer un déplacement d'eau vers l'intérieur de la cellule, sous réserve que celle-ci soit vivante, pour assurer l'équilibre osmotique. Cet influx d'eau va induire un gonflement du spermatozoïde et une incurvation du flagelle qui seront visibles au microscope optique. Au contraire, chez les spermatozoïdes morts, aucune modification morphologique ne peut être observée puisque la membrane lésée n'a pas assuré son rôle (**Jeyendran et al 1992**).

La figure 13 montre les diverses variations morphologiques que l'on peut observer suite au test HOS chez les spermatozoïdes.

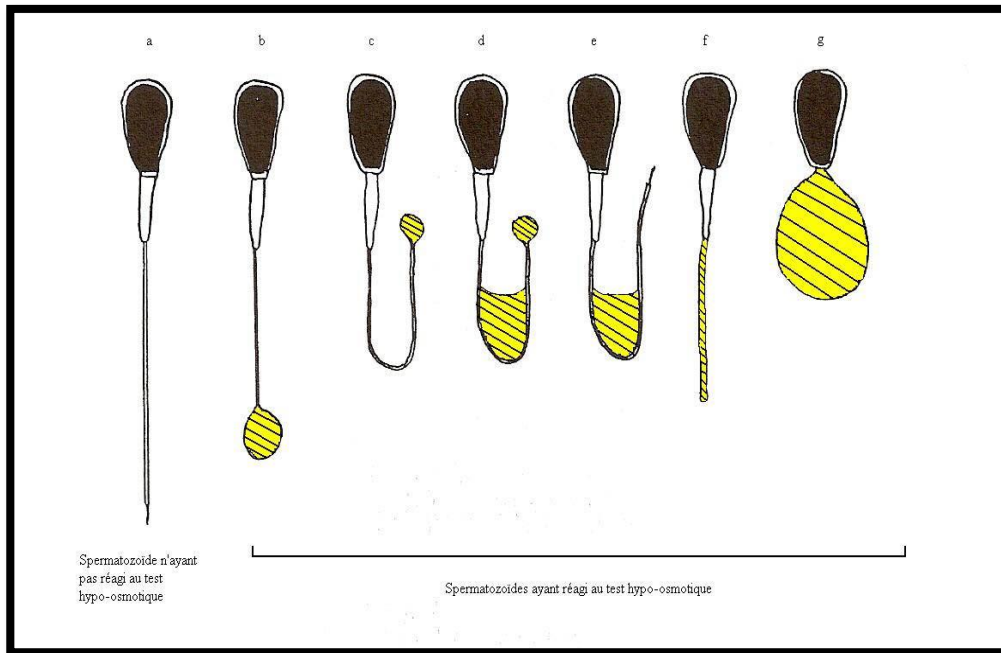


Figure n°13 : Les modifications morphologiques des spermatozoïdes soumis au test Hypo-osmotique. (Jeyendran et al, 1992).

3.1.4. Spermocytogramme (morphologie du spermatozoïde) :

La coloration Eosine-Nirgosine permet également d'examiner la morphologie des cellules. On peut utiliser d'autres colorations comme la Giemsa modifiée, Schorr modifié ou la coloration Spermac® (constitué des colorants rose de Bengale et rouge neutre).

Les anomalies de morphologie des spermatozoïdes sont résumées dans le tableau 5.

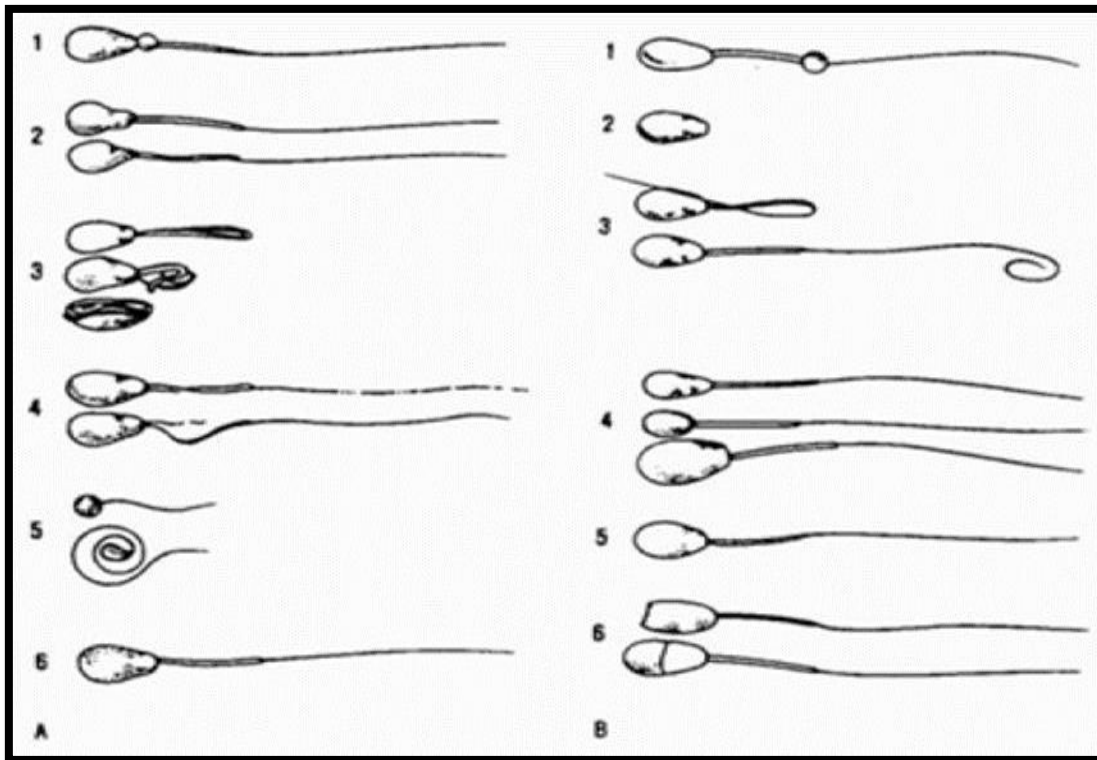
Tableau 5 : Classification des anomalies morphologiques des spermatozoïdes
(Vinciguerra L., 2015).

Anomalies de la tête	Anomalies de l'acrosome	Anomalies de la pièce intermédiaire	Anomalies de la queue
<ul style="list-style-type: none"> - Présence de deux têtes - Présence d'une tête trop petite - Présence d'une tête trop grosse - Présence d'une tête détachée - Autres anomalies 	<ul style="list-style-type: none"> - Acrosome endommagé - Acrosome détaché 	<ul style="list-style-type: none"> - Présence de gouttelettes cytoplasmiques résiduelles - Pièce intermédiaire courbe - Pièce intermédiaire double - Pièce intermédiaire mal implantée 	<ul style="list-style-type: none"> - Queue enroulée sur elle-même - Queue fléchie - Queue brisée - Queue double - Queue pliée

On peut également classer les anomalies en fonction de leur répercussion sur la fertilité de l'animal comme le montre la figure 14.

Pour objectiver quantitativement ces anomalies, il est possible de calculer l'Index d'Anomalies Multiples (IAM) correspondant au nombre total d'anomalies divisé par le nombre total de spermatozoïdes anormaux.

On qualifie une semence de « bonne » si elle contient plus de 70% de spermatozoïdes morphologiquement normaux, moins de 10% d'anomalies morphologiques majeures et moins de 20% d'anomalies morphologiques mineures. Si, au contraire, la semence contient trop de spermatozoïdes présentant des anomalies morphologiques, on parle de tératozoospermie.



A : Anomalies majeures	B : Anomalies mineures
1- Gouttelettes cytoplasmiques proximales	1- Gouttelettes cytoplasmiques distales
2- Têtes piriformes	2- Têtes normales sans queue
3- Queues bouclées ou enroulées en chignon, queue enroulée autour de la tête	3- Queues repliées ou enroulées à l'extrémité
4- Déformation de la pièce intermédiaire	4- Têtes étroites, petites ou géantes
5- Mauvais développement	5- Implantation abaxiale
6- Cratère	6- Acrosomes anormaux (plissés, détachés)

Figure n° 14 : Principales anomalies morphologiques des spermatozoïdes (Ottle et al, 1987).

3.1.5. L'analyseur d'images automatisé :

L'automatisation de l'analyse des spermatozoïdes permet de s'affranchir de la subjectivité du manipulateur et d'analyser un grand nombre de cellules en un temps réduit. Une technique a donc été développée chez l'homme et a ensuite été adaptée et validée chez le chien (ainsi que d'autres espèces domestiques) (**Iguer-ouada M, Verstegen JP 2001**). Cette technique se nomme CASA (Computer Aid Sperm Analysis) et a été créée il y a une vingtaine d'année par Doot et Foster.

L'appareillage de cette technique est composé de :

- Un système optique interne avec un microscope à lumière intermittente (permettant de s'affranchir de l'image floue imposée par les mouvements permanents des spermatozoïdes).
- Une platine chauffante à 37°C pour maîtriser la température et éviter un choc thermique aux spermatozoïdes.
- Une caméra et un convertisseur d'image.
- Un ordinateur qui permet d'afficher les images à l'écran et qui contient surtout le logiciel IMSI Strict™ (Intracytoplasmic Morphologically Selected Sperm Injection) qui va analyser les images.



Figure 15: Hamilton-Thorne IVOS II.

Pour effectuer l'analyse, on place un échantillon de trois microlitres de sperme à l'aide d'une micropipette dans une cellule de Leja® qui contient quatre chambres comme celle présentée dans la photographie 5. Au sein de l'appareil, la cellule de Leja® est maintenue à 37°C ; il est donc important de la placer sur une platine chauffante avant son utilisation pour éviter un choc thermique aux spermatozoïdes.



Figure 16: Cellule de Leja® à quatre chambres.

Le logiciel informatique va analyser une succession d'images et reconstituer la trajectoire propre de chaque spermatozoïde en reconnaissant leur tête et en suivant leurs mouvements ainsi que la morphologie de l'ensemble de la cellule. Rijsselaere et al recommandent d'effectuer l'analyse d'une semence concentrée à cinquante millions de spermatozoïdes par millilitre, L'analyse de ces images va permettre de donner une grande quantité d'informations objectives sur la semence et adaptée à chaque appareil (**Boryshpolets S et al 2013**) :

- La mobilité individuelle des spermatozoïdes :
 - La mobilité progressive des spermatozoïdes (PROG).
 - La mobilité rapide (RAP), la mobilité moyenne (MED).
 - La mobilité lente (SLOW).

- Les vitesses de déplacement des spermatozoïdes :
 - La vitesse progressive moyenne (VAP, Velocity Average Pathway) exprimée en micromètre par seconde ($\mu\text{m/s}$).
 - La vitesse linéaire (VSL, Velocity Straight Line) exprimée en $\mu\text{m/s}$ (il s'agit de la vitesse de déplacement du spermatozoïde sur une droite fictive reliant la position de sa tête sur la première image analysée et la position de sa tête à la fin de l'analyse).
 - La vitesse curvilinéaire (VCL, Velocity Curvilinear Line) exprimée en $\mu\text{m/s}$ (c'est la vitesse de déplacement du spermatozoïde en une seconde sans tenir compte de sa trajectoire).

La figure 17 représente ces trois vitesses.

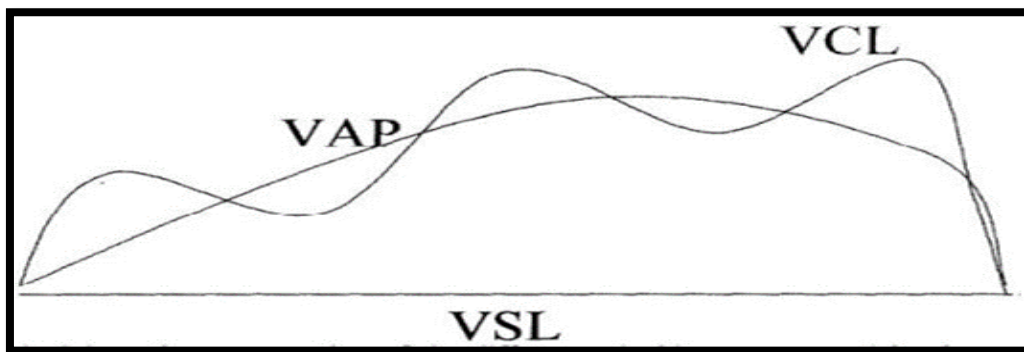


Figure 17 : Représentation schématique des trois vitesses étudiées chez les spermatozoïdes.

- La vivacité des spermatozoïdes :
 - L'amplitude des mouvements latéraux de la tête (ALH, Amplitude Lateral Head) exprimée en μm .
 - La fréquence des battements de la tête (BCF, Beat Cross Frequency) exprimée en Hertz (Hz).
 - L'élongation des spermatozoïdes (ELON) exprimée en pourcentage (qui est le rapport entre la longueur minimale et maximale de la tête à la queue du spermatozoïde).
- Le comportement des spermatozoïdes :
 - La rectitude (STR, Straightness) exprimée en pourcentage c'est le rapport ($\text{VSL/VAP} \times 100$).

- La linéarité (LIN, Linearity) exprimée en pourcentage c'est le rapport $(VSL/VCL) \times 100$.
- La concentration de la semence
- Le nombre de cellules comptées
- L'image visible sur l'écran permet d'observer des anomalies potentielles de morphologie.

Remarque : lorsque l'on a recours à l'analyseur d'image, la semence doit être diluée à 25 millions de spermatozoïdes par millilitre. En effet, lorsque la semence est trop concentrée, les spermatozoïdes vivants peuvent, en se déplaçant, venir heurter les spermatozoïdes morts et les faire bouger. Ce phénomène contribue à l'augmentation du nombre de résultats faussement positifs donnés par l'analyseur d'image.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Lieux d'expérience :

Notre étude a été réalisée au niveau de la Plateforme Biotechnologique en Reproduction des Carnivores (PBRC) de l'université de Blida1.



FIGURE 18 : Plateforme (PBRC) de l'université de Blida1.

1.2. Matériels :

1.2.1. Matériel Biologique :

Pour réaliser l'ensemble des expériences, nous avons utilisé la semence de 06 chiens Nous avons prélevé vingt éjaculats à partir de six (06) chiens différents récoltés à 48 h d'intervalle minimal. Les chiens utilisés pour notre expérimentation sont :(tableau n°8)

Tableau n°6 : identification de chaque animal.

Non de chien	Race	Age
CHOPPER	Berger belge	6
ASCKO	Berger belge	9
FIDEL	Berger allemand	3
TYRON	Berger belge	10
LUCKY	Berger allemand	13
FAX	Berger allemand	10



Figure 19 : photos des chiens inclus dans la partie expérimentale.

1.2.2. Matériels :

Pour la réalisation de notre travail (spermogramme et spermocytogramme), le matériel suivant a été utilisé :

1.2.2.1. Matériel de récolte de semence canine

- ✓ Etuve réglée à 37°C
- ✓ Cônes de récolte en silicone
- ✓ Gel lubrifiant aspermicide
- ✓ Tube en verre pyrex non gradué
- ✓ Tube à fond conique en verre pyrex gradué à 1/10^{ème} de ml.
- ✓ Bain marie réglé à 37°C



Figure 20 : Etuve, matériel de récolte et bain marie.

1.2.2.2. Matériels d'examen initial de la semence :

- ✓ Photomètre calibré pour mesure de la concentration de la semence canine de marqueSDM1 MINITUB
- ✓ Un microscope optique de marque OPTICA à contraste de phase.
- ✓ Un microscope optique de marque NIKON E100 à contraste de phase et à platine chauffante



Figure 21 : Photomètre calibré de marque SDM1 MINITUB



Figure 22 : microscope optique de marque NIKON E100 à platine chauffante

1.2.2.3. L'analyseur Hamilton-Thorne IVOS II :

- ✓ Il s'agit d'un système il s'agit d'un analyseur d'image comprenant un éclairage stroboscopique par illumination de diode pour produire des images nettes et plus précises, un système d'enregistrement pour favoriser le suivi de l'analyse du sperme, une classification automatisée des mouvements des spermatozoïdes
- ✓ Chambre d'analyse LEJA ® à 4chambres de 20µm.



Figure 23 : L'analyseur Hamilton-Thorne IVOS II

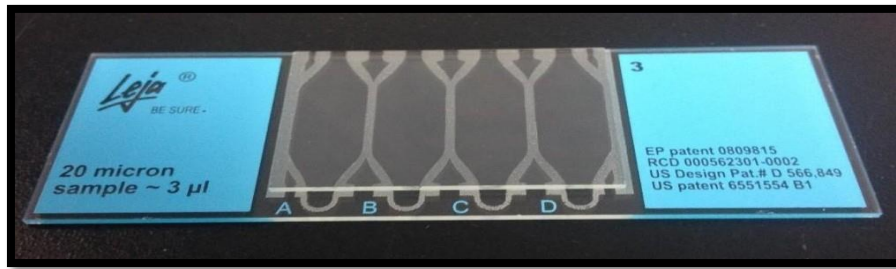


Figure 24 : Cellule de Leja® à quatre chambres (MARTINOT, 2016).

1.2.2.4. Matériels de comptage :

Les éléments nécessaires pour réaliser un comptage de cellule avec un hémocytomètre sont les suivants : (figure30)

- Un échantillon à mesurer (40µl de sperme).
- Hémocytomètre ou plaque de Neubauer.
- Microscope optique.
- Micropipette : un instrument de laboratoire qui permet de mesurer un aliquote de liquide avec précision. Pourvue d'une pointe stérile jetable. Les plus commune sont calibrées pour une capacité de 20, 200,1000µl.
- Un diluant (NaCl à 4%), pour la dilution (1/100^{ème}).
- Un vortex.



Figure 25 - Matériel nécessaire pour le comptage des cellules.

1.2.2.5. Matériels de dilution et préparation de la semence :

- ✓ Platine chauffante histologique
- ✓ Agitateur
- ✓ Des gants stériles
- ✓ Les pipettes de 1000 μ l, 100 μ l ,50 μ l ,20 μ l
- ✓ Les embouts pour pipettes
- ✓ Tube de micro centrifugation (Eppendorf)
- ✓ Portoir pour Eppendorf
- ✓ Solution de dilution commerciale (EasyBuffer B).



Figure n° 26 : différents matériels utilisés pour l'analyse de la semence.

1.3. Méthodes :

1.3.1. Récolte de la semence :

Pour notre expérience, nous avons récolté la semence de chaque animal manuellement, et de façon fractionnée sur trois tubes (fraction pré-spermatique, spermatique et post-spermatique), selon la technique décrite dans la première partie de notre thèse. Nous avons réchauffé les tubes et les cônes dans une étuve et nous avons maintenus à une température de 37°C.

Les trois fractions sont évaluées, mais seulement la fraction riche en spermatozoïdes (deuxième) est utilisée.

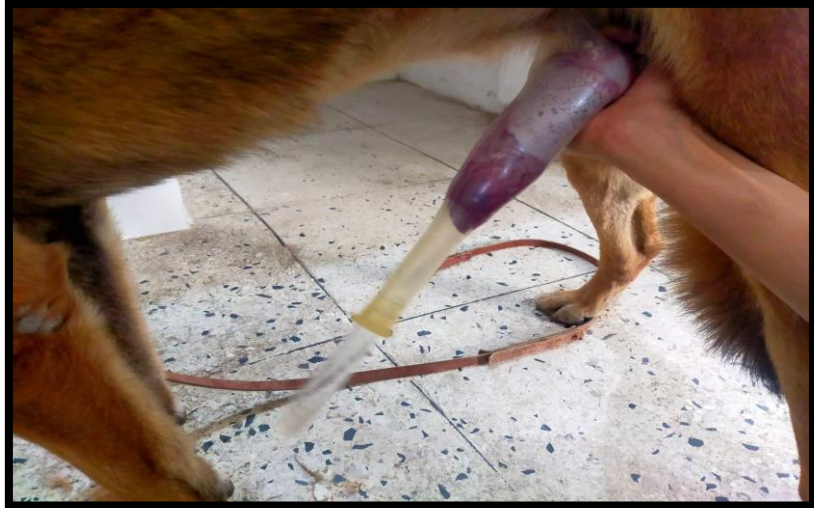


Figure n° 27 : la récolte de sperme chez le chien

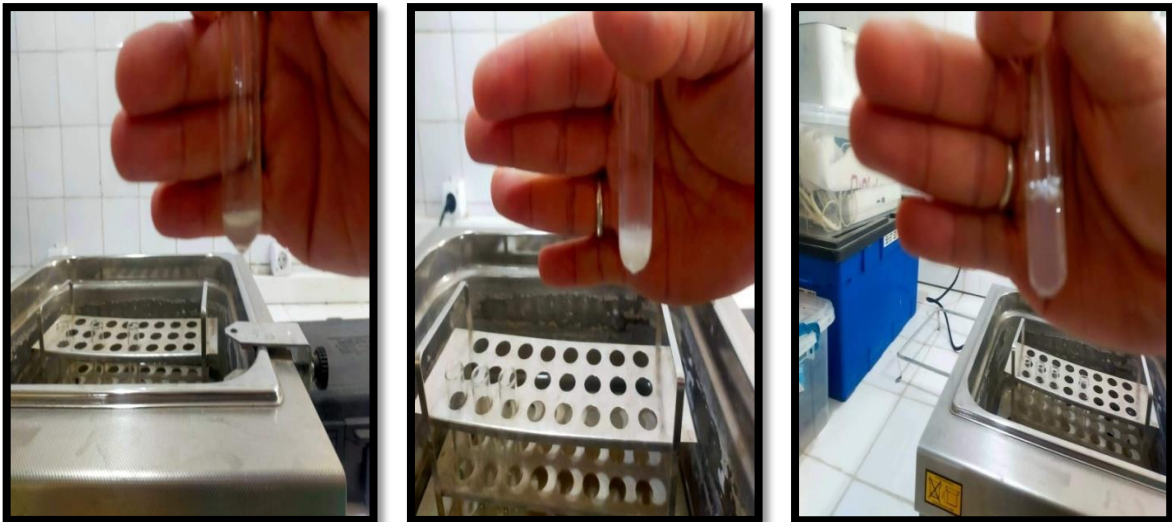


Figure n° 28 : Les trois différentes fractions spermatiques recueillies chez le chien
(Pré spermatique, spermatique, post-spermatique)

1.3.2. Evaluation initiale de la semence :

Chaque éjaculat a été évalué immédiatement après sa collecte pour juger de sa qualité et la mobilité massale, individuelle et la mesure de la concentration en spermatozoïdes.

1.3.2.1. Mesure de la concentration des spermatozoïdes :

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. Cet appareil avait déjà fait l'objet d'un étalonnage externe dans notre laboratoire au regard de la technique conventionnelle recommandée par l'OMS (Cellules de type amélioré de Neubauer).



Figure n° 29 : Le photomètre SDM1, Minitub.

1.3.2.2. Mobilité massale :

Une goutte de sperme frais est déposée sur une lame préchauffée et observée immédiatement au microscope à platine chauffante (+37°C) avec un faible grossissement(x100). 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.

Seulement les éjaculats avec une mobilité massale de «3 » et plus sont inclus dans notre étude.

1.3.2.3. Mobilité individuelle :

Une goutte de sperme dilué avec du liquide prostatique est déposée entre lame et lamelle et observée au grossissement (x400). Le pourcentage des spermatozoïdes fléchants (ayant des déplacements rapides en lignes droites) est apprécié subjectivement et une note est donnée entre 0 et 5 (0% - 100%).**Seuls les éjaculats possédant une mobilité individuelle de 3 (60 – 70%) à plus sont inclus dans l'étude.**



Figure °30 : Dépôt d'une goutte de semence sur une lame pour évaluation

1.3.2.4. Comptage des cellules :

a- Préparation de l'échantillon

L'échantillon doit être préparé avec une concentration adéquate pour le comptage la gamme des concentrations qui permet le comptage d'hémocytomètre se situe entre 250 000 et 2,5 millions de cellules par 1ml de cellules.

- On utilise un diluant hypertonique (NaCl à 4%) pour réaliser une dilution de (1/100^{ème}), 40µl de semence et on ajoute 3960µl de NaCl à 4%.
- On homogénéise pendant 10 Sec avec un vortex.

b- remplissage de la plaque de Neubauer

- 1- On place la pipette au bord du couvre-objet, à l'extrémité de la plaque de Neubauer pour laisser 10µl de liquide pénétrer entre la plaque et le couvre-objet par capillarité.
- 2- On mélange la dilution pour la deuxième chambre comme ci-dessus, et on retire immédiatement un deuxième 10µl de l'aliquote. Et on Charge la deuxième chambre de l'hémocytomètre en suivant les étapes déjà citées.
- 3- L'hémocytomètre est placé horizontalement pendant au moins 15 minutes à température ambiante dans une chambre humide (par exemple sur du papier filtre saturé d'eau dans une boîte de Pétri couverte) pour éviter le dessèchement. Les cellules immobilisées vont sédimenter sur la grille.

c- Calcul du nombre total de Spz.

Le nombre de spermatozoïdes doit être évalué dans les deux chambres de l'hémocytomètre. Si les deux valeurs concordent, les aliquotes prélevées peuvent être considérées comme représentatives de l'échantillon selon le Guide de l'OMS (2010,2021).

- Il faut compter au moins 200 spermatozoïdes dans chaque répliquât, afin d'obtenir une erreur, il faut compter au moins 200 spermatozoïdes dans chaque répliquât.



Figure 31 : comptage des spz.

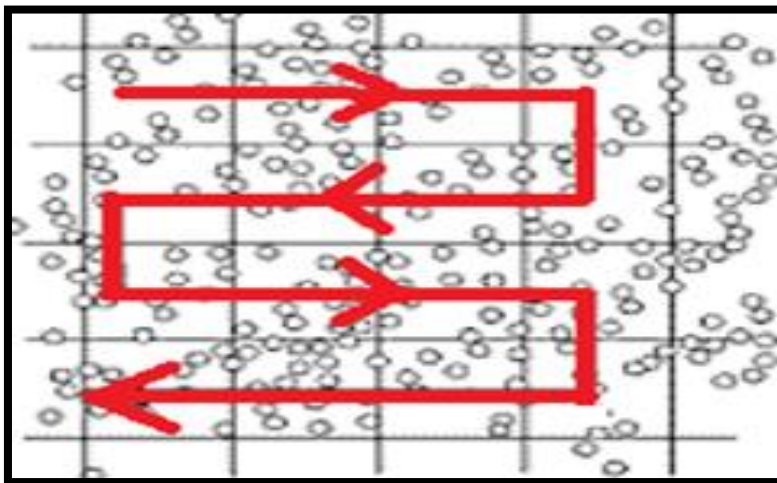


Figure 32 : sens de comptage.

- On note le nombre de lignes évaluées pour atteindre 200 SPZ puis reprendre La même opération pour l'autre chambre de l'hémocytomètre.

-

b- Calcul de la concentration

- On calcule la somme et la différence des deux nombres (somme des N).
- Le nombre de spermatozoïdes compter dans les deux chambres (N) divisé par le volume Dans lequel ils ont été trouvés, c'est le volume du nombre total de rangées examinées (n) dans les deux chambres.
- La formule pour calculer la concentration : $N/n \times (1/20) \times \text{facteur de dilution}$.

Les résultats ont été reportés sur les fiches d'analyse de chaque chien.

Tableau 7: Différences acceptables entre deux comptes de réplication pour une somme donnée sur la base de l'intervalle de confiance arrondi à 95%.

Sum	Acceptable Difference*	Sum	Acceptable Difference*
144-156	24	329-346	36
157-169	25	347-366	37
170-182	26	367-385	38
183-196	27	386-406	39
197-211	28	407-426	40
212-226	29	427-448	41
227-242	30	449-470	42
243-258	31	471-492	43
259-274	32	493-515	44
275-292	33	516-538	45
293-309	34	539-562	46
310-328	35	563-587	47

1.3.2.5. Analyse spermatique par le système HT-IVOS II® :

L'analyse informatique de la semence a été effectuée au moyen d'un système Hamilton Thorne IVOS II version 1.4 appartenant au laboratoire d'analyse spermatique de la PBRC/UB1, et une lame d'analyse Léja® à quatre chambres de 20µl de profondeur (Voir figure n° 24). Ce système se compose d'un microscope à contraste de phase négative et à platine chauffante et d'une caméra, reliée à un logiciel d'analyse d'image logiciel IMSI-STRICT™ (Intracytoplasmic Morphologically Selected Sperm Injection) (Voir figure n°23).

Les étapes de préparation de l'échantillon, de remplissage de la lame et analyse par le système sont comme suit :

1.3.2.5.1. Dilution :

Avant d'être analysée par le système IVOS II, la semence a été diluée à la concentration de 25 millions de spermatozoïdes par millilitre au moyen d'une solution tampon commerciale (Easy Buffer B, IMV-Technologies, Aigles, France), puis mise en incubation à 37°C (étuve MEMMERT) pendant 10 min.

L'analyse de la semence par HT-IVOS II a été faite selon le paramétrage technique adapté à la semence canine.

Dilution de l'éjaculat par une solution tampon du commerce (EasyBuffer B, IMV-Technologies) jusqu'à une concentration d'analyse comprise entre 20 à 30 millions spz/ml, selon les recommandations du fabricant.



Figure 33 : Etapes de dilution de la semence.

Le préchauffage de la lame Léjà (platine histologique à 37°C)

Préparation du système (température de la platine à 37°C ; choix du setup canin, HBM 187 AREA 16).

Mise de la lame en porte lame du système.

Remplissage de la lame par 3µl de semence diluée dans une chambre (A, B, C, D) au moyen d'une micropipette P20 et un embout adapté.

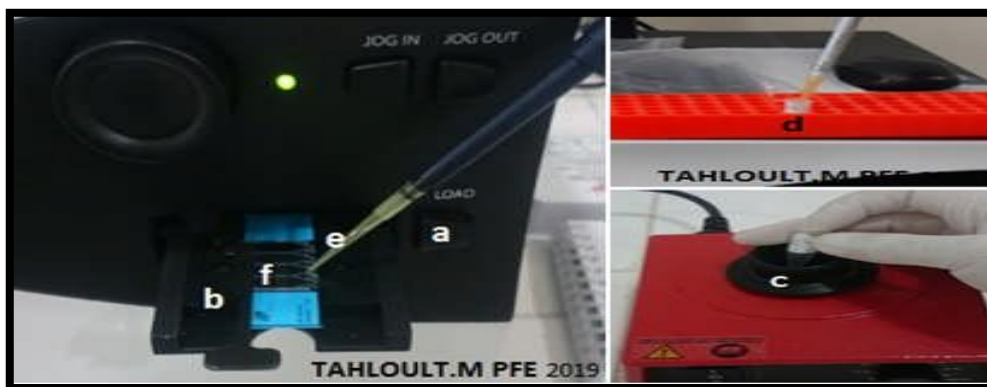


Figure 34– remplissage de la lame Leja.

1.3.5.2.2. Mesure :

- Faire la mise au point.
- Saisir toutes les informations : espèce animal, le nom du chien, lignée génétique, numéro de l'éjaculat, le volume,
- Enregistrement de l'analyse sous forme d'une vidéo.

1.3.5.2.3. Les paramètres cinétiques générés par le système HT-IVOS II :

- ✓ (PROG).La mobilité progressive des spermatozoïdes
- ✓ (MED)La mobilité rapide (RAP),
- ✓ la mobilité moyenne.
- ✓ (SLOW)La mobilité lente.
- ✓ VSL (Straight line velocity) : la vitesse en ligne droite ($\mu\text{m/s}$) correspondant à la trajectoire rectiligne définie à partir de la distance entre la première et la dernière position de la tête.
- ✓ VCL (Curvilinear velocity) : la vitesse ($\mu\text{m/s}$) calculée selon la trajectoire curvilinéaire (somme des distances entre les différentes positions de la tête sur chaque image).
- ✓ VAP (Average path velocity) : la vitesse ($\mu\text{m/s}$) selon la trajectoire moyenne.
- ✓ ALH (Amplitude of lateral head displacement) : l'amplitude de déplacement latéral de la tête (μm) correspondant à la distance maximale obtenue en calculant pour chaque point constituant la trajectoire sa distance par rapport à la position moyenne (selon la trajectoire moyenne).
- ✓ LIN (linearity) : la linéarité correspond au ratio VSL/VCL en pourcentage et illustre la direction de la trajectoire
- ✓ STR (Straightness) : la rectitude de trajectoire correspond au ratio VSL/VAP et représente la linéarité de la trajectoire moyenne

Animal species:
 Animal ID: LUCKYJ17HBM120A2MOB
 Genetic Line:
 Ejaculate number:
 Batch number:
 Analysis Date: 4/17/2022 23:13:43

University of Blida 1 / ALGERIA

Carnivore Reproductive
 Biotechnologies Platform
 Quality Control Report



Motility

	Count	Sample M	Concentration M/ml	Percent Of Total
Total	623	36	72.62	100
Static	196	11	22.85	31.50
Progressive	376	22	43.83	60.40
Motile	427	25	49.78	68.50
Slow	33	2	3.85	5.30

Morph

	Count	Sample M	Concentration M/ml	Percent Of Total
Bent Tail	14	1	1.63	2.20
Coiled Tail	2	0	0.23	0.30
DMR	6	0	0.70	1
Distal Droplet	5	0	0.58	0.80
Proximal Droplet	34	2	3.96	5.50
Normal Fraction:			90.40	%

Kinematics

VCL Curvilinear velocity (um/s):	170.26	LIN % :	71.17
VAP Average path velocity(um/s):	126.35	WOB % :	75.39
VSL Straightline velocity (um/s):	119.14	ALH (um):	5.19
STR % :	92.80	BCF (Hz) :	33.14

PO BOX 270 Soumaa road 09000 Blida-Algeria. Phone/fax ; +21325.27.24.21 Cell ; +213661721940. Email ; crbp@univ-blida.dz

Figure n° 35 : les paramètres générés par le système CASA IVOS II

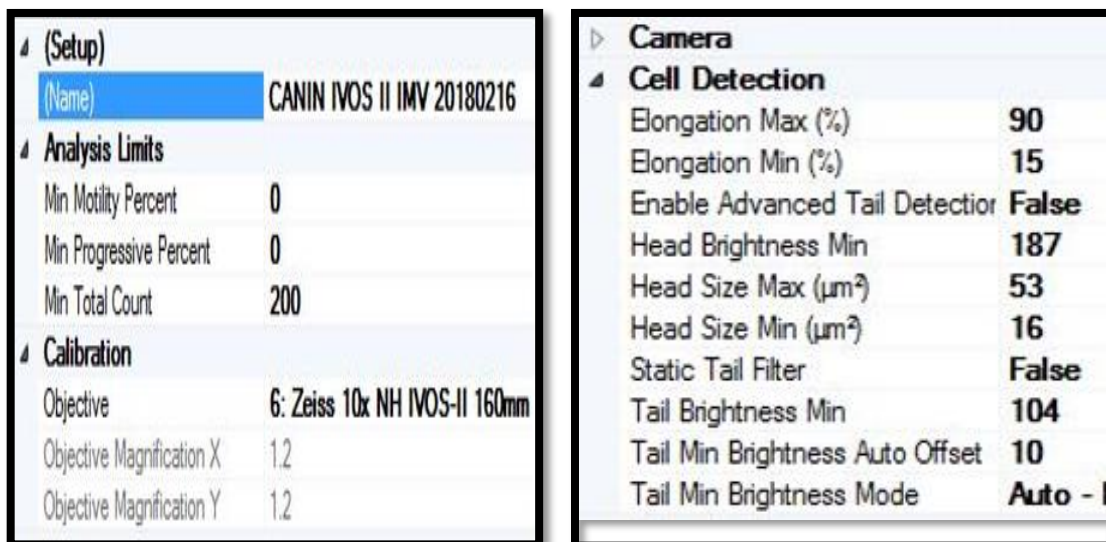
1.4. Protocole expérimental :

Avant le début de notre expérimentation proprement dite, une étude préliminaire a été effectuée sur trois éjaculats issus de trois chiens (Coco, Loulou et Floki). Son objectif étant d'évaluer grossièrement l'adéquation du paramétrage de détection cellulaire recommandé par le fabricant et son effet sur la capacité du système à capturer les spz.

Dans cette étude, 20 éjaculats ont été récoltés à partir de 6 chiens (Voir tableau n°8). Chaque éjaculat a été soumis à un contrôle de qualité initial, évaluant la mobilité massale, et individuelle ainsi que la concentration spermatique par photomètre.

Chaque éjaculat remplissant les conditions d'inclusion dans l'étude est dilué comme décrit précédemment, pour être analysé par le système HT-IVOS II et par numération cellulaire microscopique standard (cellule de Neubauer).

L'analyse informatique (CASA) de l'éjaculat a été faite selon le paramétrage (Setup) recommandé par le fabricant (**Voir Figure n° 36**) et le résultat d'analyse a été enregistré sous forme de vidéo. Cette dernière a été par la suite ré analysée suivant plusieurs paramétrages (setup) expérimentaux résultant de la variation de deux paramètres de détection cellulaire à savoir la brillance minimale (HBM, pou Head Brightness Minimum) ainsi que la surface (Area, μm^2) de la tête du spz.



Setup	
(Name)	CANIN IVOS II IMV 20180216
Analysis Limits	
Min Motility Percent	0
Min Progressive Percent	0
Min Total Count	200
Calibration	
Objective	6: Zeiss 10x NH IVOS-II 160mm
Objective Magnification X	1.2
Objective Magnification Y	1.2

Camera	
Cell Detection	
Elongation Max (%)	90
Elongation Min (%)	15
Enable Advanced Tail Detection	False
Head Brightness Min	187
Head Size Max (μm^2)	53
Head Size Min (μm^2)	16
Static Tail Filter	False
Tail Brightness Min	104
Tail Min Brightness Auto Offset	10
Tail Min Brightness Mode	Auto -

Figure n° 36 : setting recommandé par le fabricant

Dans un but d'optimisation et de standardisation du setup d'analyse informatique par le système HT-IVOS II, ces deux facteurs (HBM et Area) ont été variés comme suit : (HBM : 100, 120, 140, 160, 180, 200 ; Area : 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14). Ce protocole expérimental est représenté graphiquement par la **figure n° 37**.

Les 20 vidéos enregistrées des 20 éjaculats étudiés (n=20) ont été ré analysées selon le protocole ci-dessus, ce qui a permis l'obtention de **560 analyses IVOS II**.

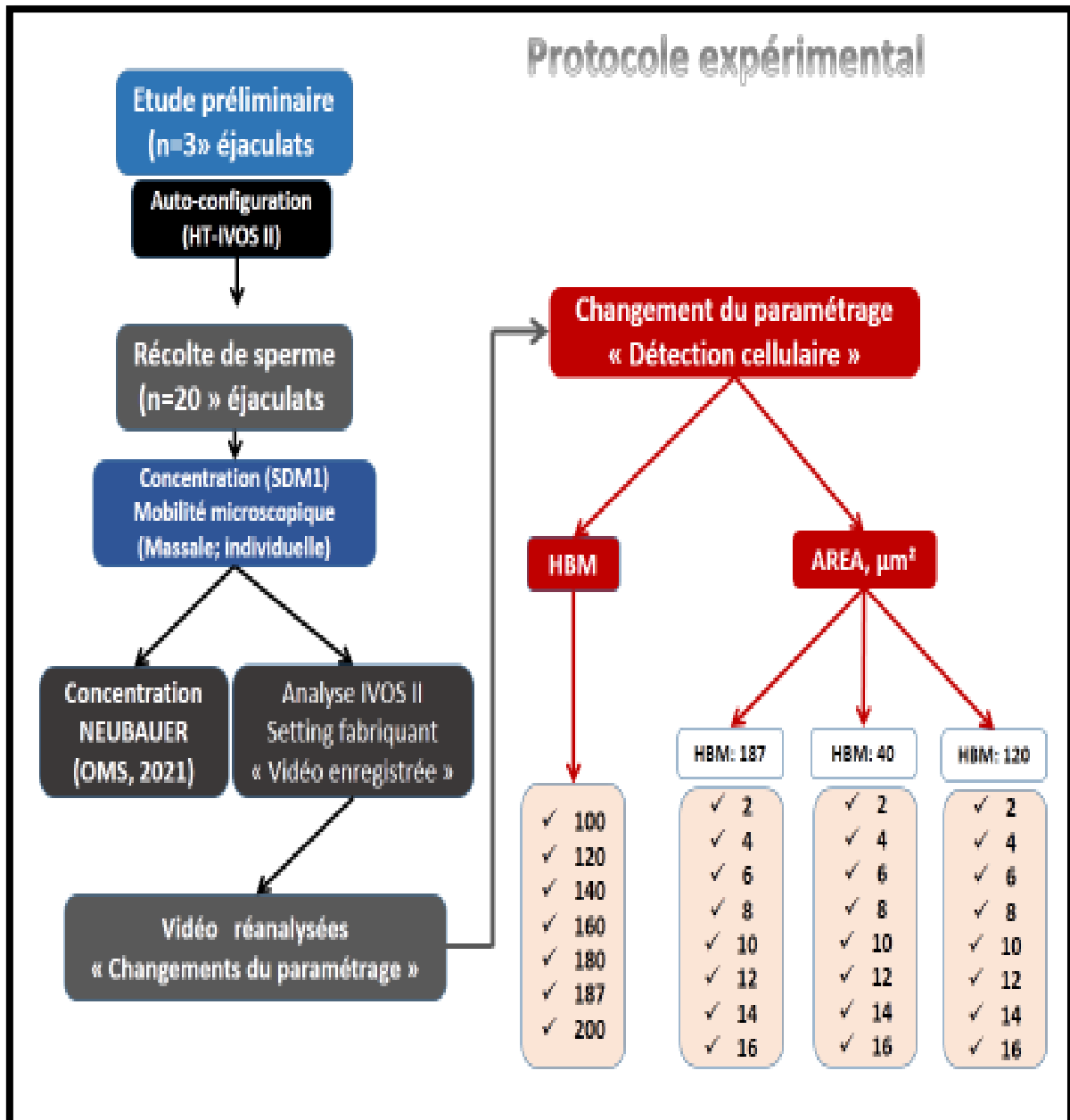


Figure n° 37 : protocole expérimental.

1.5. Saisie des données

Les données brutes des 561 analyses IVOS II ont été récupérées du système puis saisies sur un fichier Excel comportant un tableau de 10 colonnes (pour 10 paramètres cinétiques et 2 facteurs de variation étudiée) et 560 lignes représentant le nombre d'analyse effectuées de notre étude.

1.6. Analyse statistique :

L'analyse statistique des données brutes des 20 éjaculats (n=20) et 561 analyses IVOS II a été effectuée par le logiciel IBM – SPSS version 26, © 2017.

Après une analyse descriptive, les tests de comparaison de moyennes suivants ont été appliqués :

- ANOVA
- GLM
- Corrélation
- Régression

Les résultats ont été présentés sous forme de moyenne \pm SEM (Erreur standard de la moyenne), et le pourcentage de significativité a été fixé à 5% ($p < 0,05$).

2. RESULTATS

2.1. Etude préliminaire :

Conduite au moyen de la fonction « auto-configuration » du système IVOS II sur trois éjaculats :

2.1.1. Evaluation de l'effet des paramètres de détection cellulaire :

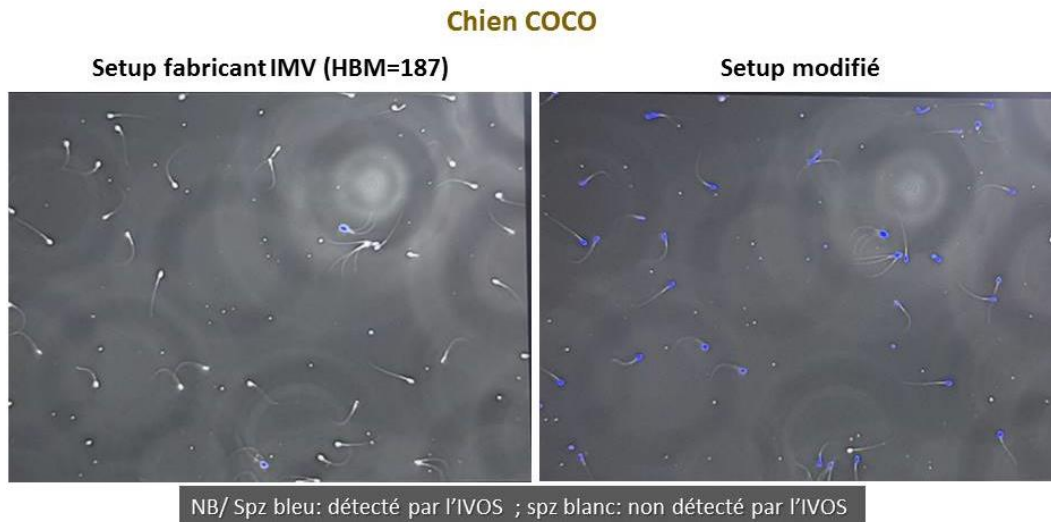


Figure n° 38 : Effet de la brillance « MHB » sur la détection des spz canin par le système HT-IVOS II «Par l'outil auto-configuration du système»

2.1.2. Choix des facteurs de détection cellulaire à étudier :

▶ Camera	
▲ Cell Detection	
Elongation Max (%)	90
Elongation Min (%)	15
Enable Advanced Tail Detector	False
Head Brightness Min	187
Head Size Max (μm^2)	53
Head Size Min (μm^2)	16
Static Tail Filter	False
Tail Brightness Min	104
Tail Min Brightness Auto Offset	10
Tail Min Brightness Mode	Auto - First Frame

Figure n° 39 : Le setting de détection cellulaire du système HT-IVOS II recommandé par le fabricant (IMV Technologies).

L'étude préliminaire a porté sur trois éjaculats issus de trois chiens (Coco, Loulou et Floki). Elle a été rendue possible grâce à la fonction « auto-configuration » du logiciel d'analyse d'image qui contrôle le système d'illumination avant analyse ainsi que les paramètres de détection cellulaire. Elle permet de recouvrir les spermatozoïdes détectés par un calque bleu « overlay » alors que les spz non détectés restent blancs (Voir Figure n° 38). Les différents paramètres (Voir Figure n° 39) ont été changés et la détection cellulaire correspondante appréciée sur les photos prises par capture d'écran systématiquement.

Cette étude a permis de mettre en évidence l'effet de deux paramètres qui sont les seuils « minimum » de brillance (contraste) et de taille (AREA, μm^2) de la tête du spermatozoïde sur la capacité du logiciel d'analyse d'image à détecter ces cellules.

2.1.2.1. La brillance minimale de la tête du spermatozoïde « HBM » :

La brillance minimale de la tête (HBM, pour Head Brightness Minimum) est l'intensité lumineuse minimale avec laquelle doit briller la tête du spz pour être détectée par le logiciel d'analyse d'image. C'est le contraste de la tête du spz par rapport au fond de l'image.

La valeur recommandée par le fabricant étant de 187 pour la détection du spz canin et 180 pour le spz bovin et équin. Récemment, la valeur de 168 a été recommandée pour le spz bovin congelé par O'meara et ses collaborateurs (O'meara et al., 2021).

2.1.2.2. La taille (surface μm^2) minimale de la tête du spermatozoïde :

La taille minimale de la tête du spz (AREA) encore appelée aire ou surface et exprimée en μm^2 . Ce paramètre est calculé comme l'aire d'une ellipse qui est la forme la plus proche à la tête du spermatozoïde. Elle est égale au produit des deux axes (petit et grand) de l'ellipse multiplié par 3.14 (π). Contrairement à la brillance qui est une notion physique, l'aire « AREA » est une mesure de distance ou de taille de la tête du spermatozoïde. La valeur minimale de la taille définit le seuil de détection par le logiciel d'analyse d'image. La valeur recommandée par le fabricant qui est de $16\mu\text{m}^2$.

2.2. Etude et optimisation des paramètres de détection cellulaire :

Cette section consacrée à l'étude des paramètres de détection cellulaire comporte une étude de l'effet des deux paramètres sur la concentration d'abord par une analyse de variance ensuite par une étude de corrélation par régression linéaire.

2.2.1. Effet des paramètres HBM et AREA sur la concentration :

Cette section est dédiée à l'étude des paramètres de détection cellulaire des spz canins par le système HT-IVOS II et leurs effets sur la concentration. Elle comporte une étude de l'effet de différents changements du paramétrage et des corrélations entre la concentration mesurée par HT-IVOS et celle effectuée par numération cellulaire à l'hématimètre de Neubauer.

2.2.1.1. Effet de variation du paramètre « HBM : 100-200 » avec « AREA » fixé à 187 :

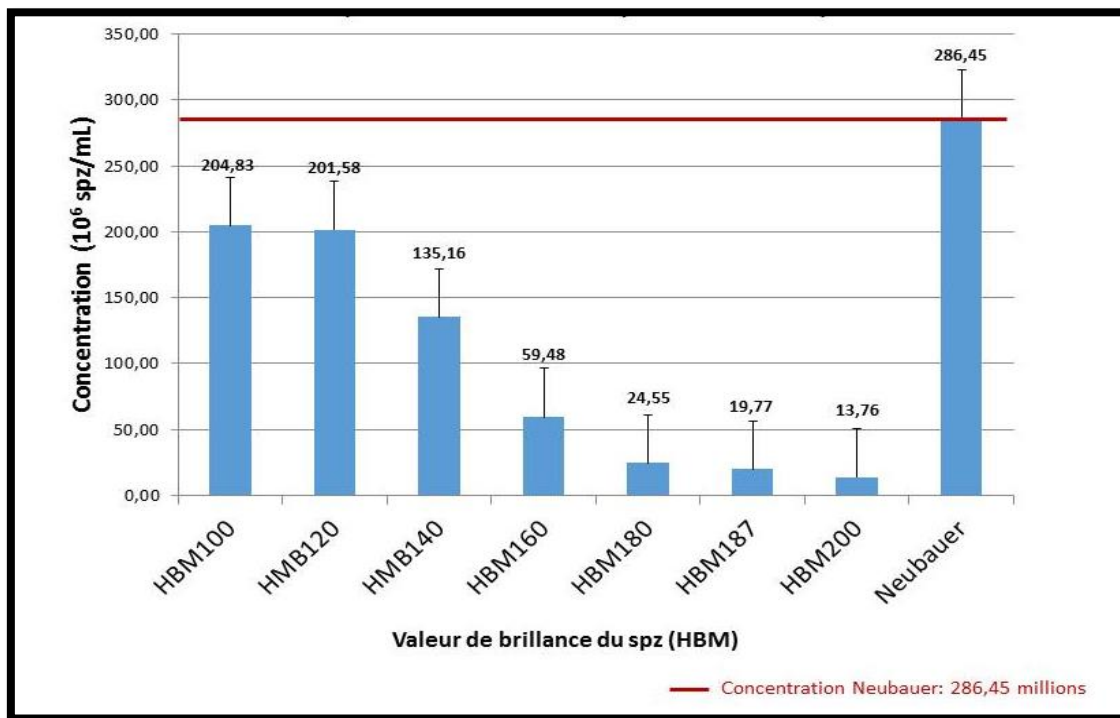


Figure n° 40 : Effet de variation « 100-200 » de la brillance minimale « HBM » sur la concentration des spz canins analysés par le système HT-IVOS II. Des lettres différentes signifient une différence significative à $p < 0.05$ ($n=20$).

L'analyse de variance a mis en évidence une différence très hautement significative ($p < 0.000$) entre les groupes et la comparaison multiple en post hoc par le test de Tukey est représentée par les lettres de signification sur la figure n° 40.

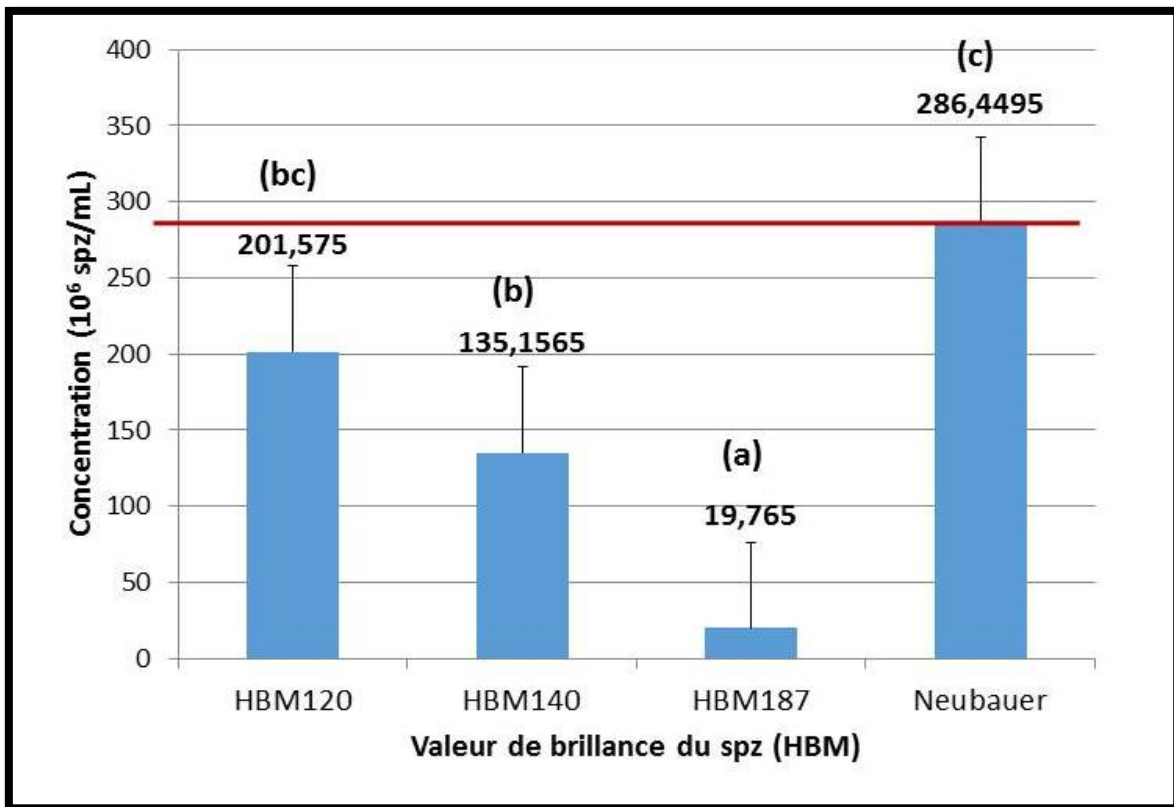


Figure n° 41 : Effet de 3 valeurs de de la brillance minimale « HBM : 187, 140 et 120 » sur la concentration des spz canins analysés par le système HT-IVOS II. Des lettres différentes signifient une différence significative à $p < 0.05$ ($n=20$).

Le paramétrage de brillance minimale de la tête du spermatozoïde canin semble avoir globalement un effet significatif ($p=0.000$) sur la concentration mesurée par le système HT-IVOS II.

La comparaison multiple effectuée par le test de « Tukey » en post Hoc entre les différentes valeurs de HBM « 100-200 » et la valeur de concentration obtenue par la technique de référence (Numération Neubauer), montre cette dernière diffère de façon très hautement significative ($p=0.000$) du système IVOS II paramétré aux valeurs d'HBM: 160-180-200 y compris la valeur recommandée par le fabricant (187), hautement significative à la valeur de 140 ($p=0.003$) mais ne montre aucune DS aux valeurs: 100-120 avec respectivement $p=0.414$; 0.362 .

2.2.1.2. Effet de variation d'AREA pour 3 valeurs de HBM:

Cette section est consacrée à l'étude du deuxième facteur qui est la taille minimale de la tête du spz « AREA, μm^2 » en fixant les valeurs du premier facteur de brillance minimale de la tête « HBM » à trois valeurs à savoir 187, la valeur témoin (recommandée par le fabricant) et les deux valeurs optimales révélées dans l'étude précédente de ce facteur.

- ✓ Effet de la variation d'AREA avec la brillance (HBM » fixée à 187 sur la concentration par l'HT-IVOS II.

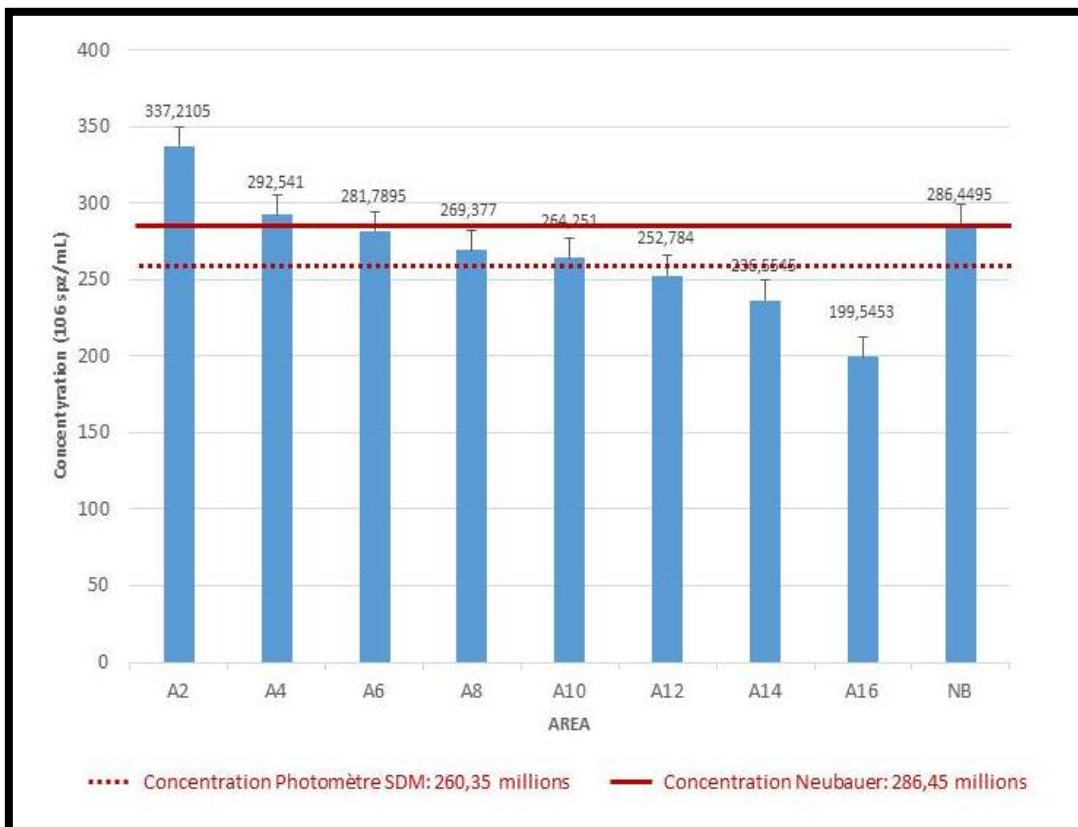


Figure n° 42 : Effet de variation « 2-16, μm^2 » de la taille minimale du spz « AREA » avec la brillance minimale « HBM » fixée à 187 sur la concentration des spz canin analysés par le système HT-IVOS II. Aucune DS n'a pu être identifiée $p=0.803$ ($n=20$).

- ✓ Effet de la variation d'AREA avec la brillance (AREA » fixée à 140 sur la concentration par l'HT-IVOS II.

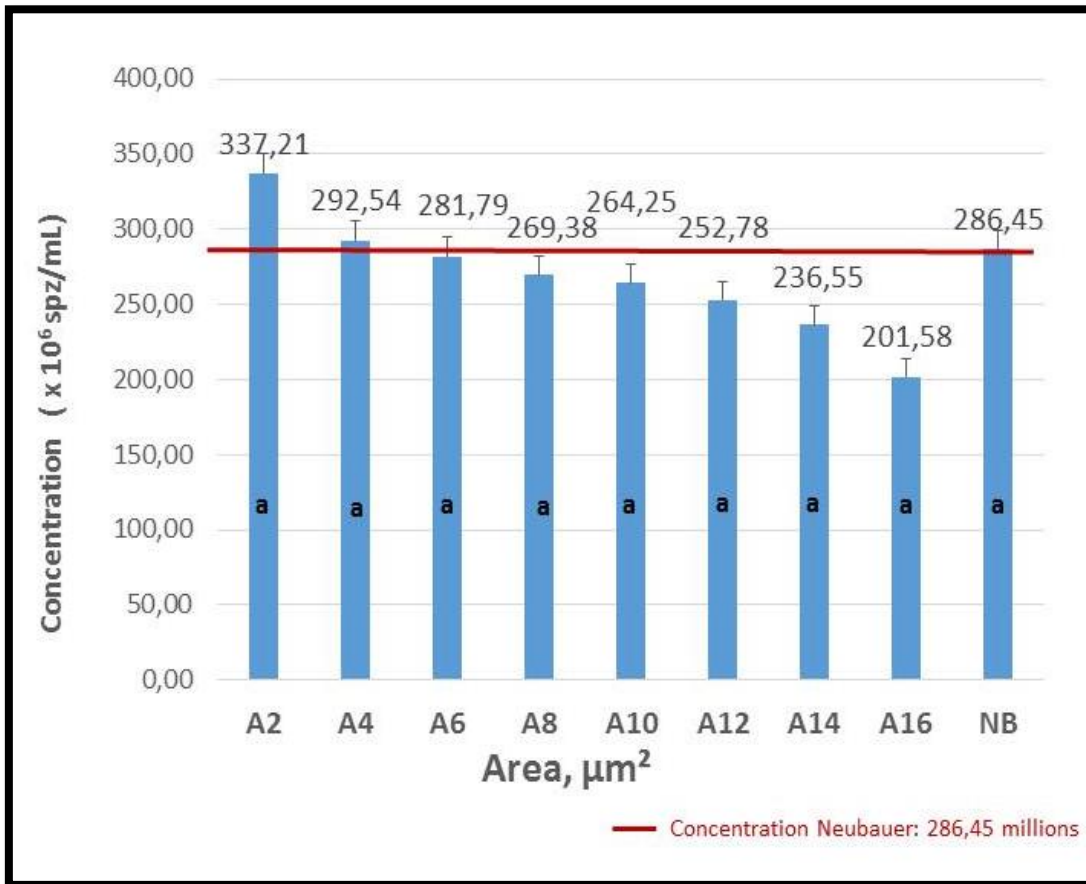


Figure n° 43 : Effet de variation « 2-16, μm^2 » de la taille minimale du spz « AREA » et HBM fixé à 120 sur la concentration des spz canin analysés par le système HT-IVOS II. Aucune DS n'a pu être identifiée $p=0.802$ ($n=20$).

- ✓ Effet de la variation d'AREA avec la brillance (AREA » fixée à 140 sur la concentration par l'HT-IVOS II.

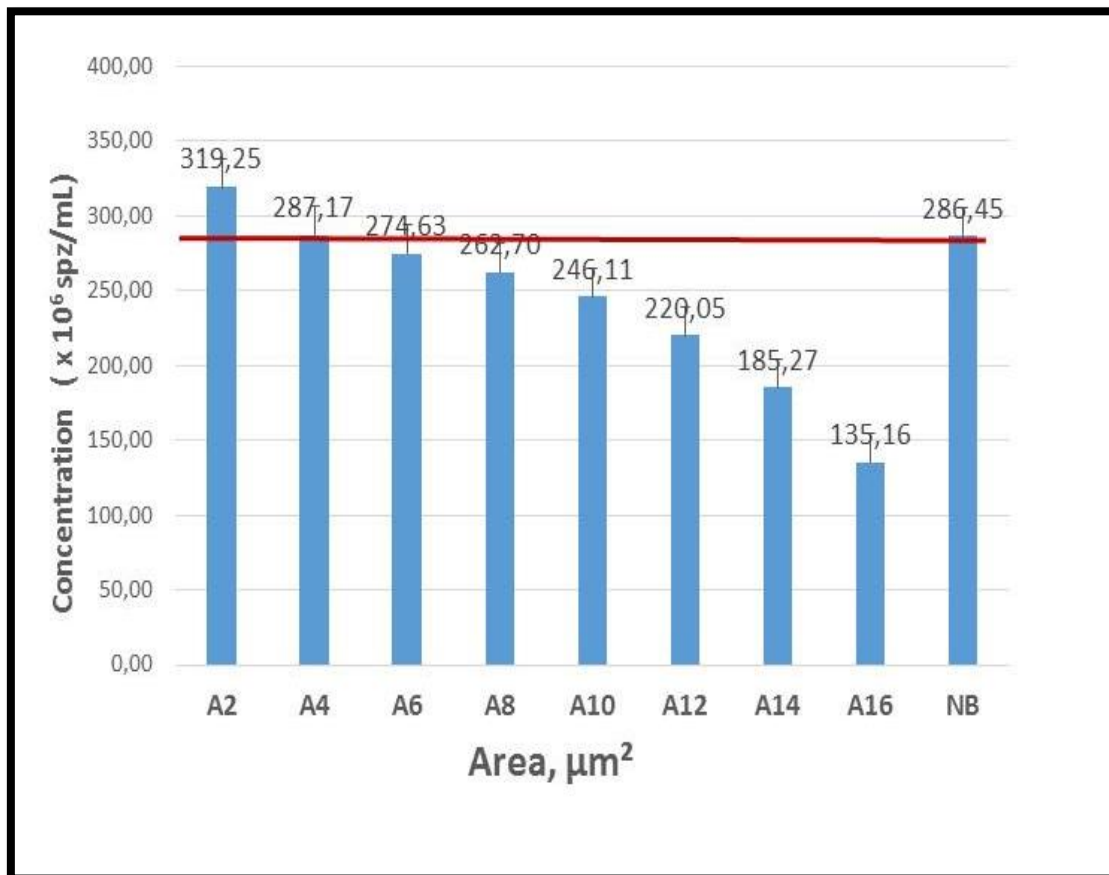


Figure n° 44 : Effet de variation « 2-16, μm^2 » de la taille minimale du spz « AREA » et HBM fixé à $140\mu\text{m}^2$ sur la concentration des spz canin analysés par le système HT-IVOS II. Aucune DS n'a pu être identifiée $p=0.149$ ($n=20$).

La taille minimale de la tête du spermatozoïde canin (AREA, μm^2) ne semble globalement pas avoir d'effet significatif ($p=0.803$) sur la concentration mesurée par le système HT-IVOS II.

Etant donné que l'ANOVA est non significative, la comparaison multiple en post hoc ne peut s'effectuer statistiquement entre les différentes valeurs de AREA « 2-16 » et la valeur de concentration obtenue par la technique de référence (Numération Neubauer). Cependant, il est aisément observable que les valeurs les plus proches à la technique de référence sont celles de 4 et 6 μm^2 avec respectivement des concentrations de 292,54 et 281,79 par rapport à la valeur de référence de 286,45 millions spz/ml, avec respectivement 6,09 et 4,66 millions d'écart. Ainsi, une nouvelle analyse de variance sera refaite sur la variation du paramètre AREA mais en ne prenant que les valeurs d'AREA associées aux catégories d'HBM de 120 et 140.

2.2.2. Etude de corrélation (Régression linéaire) entre IVOS et la technique de référence :

Cette section comprend l'étude de corrélation et de régression linéaire entre la concentration des spz canins analysés par le système HT-IVOS II avec cinq différents paramétrage « HBM-AREA : 187-16, 140-6, 140-4, 120-6 et 120-4 » et la numération à la cellule de Neubauer.

2.2.2.1. Corrélation entre la concentration par HT-IVOS II « HBM187A16 » et par numération « Neubauer » :

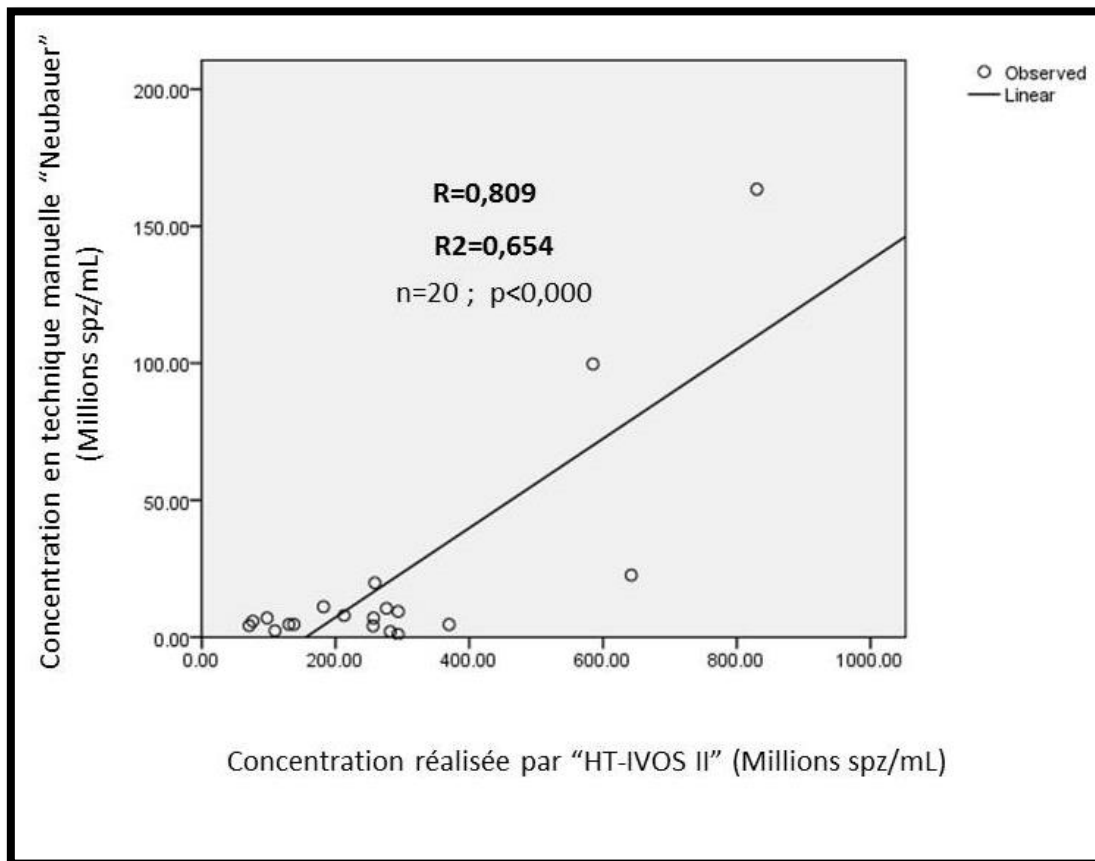


Figure n° 45 : Droite de régression linéaire entre la concentration des spz canins analysés par le système HT-IVOS II « HBM : 187 ; AREA : 16 μ m² » et la numération à la cellule de Neubauer. p=0.149 (n=20).

2.2.2.2. Corrélation entre la concentration par HT-IVOS II « HBM140A6 » et par numération « Neubauer » :

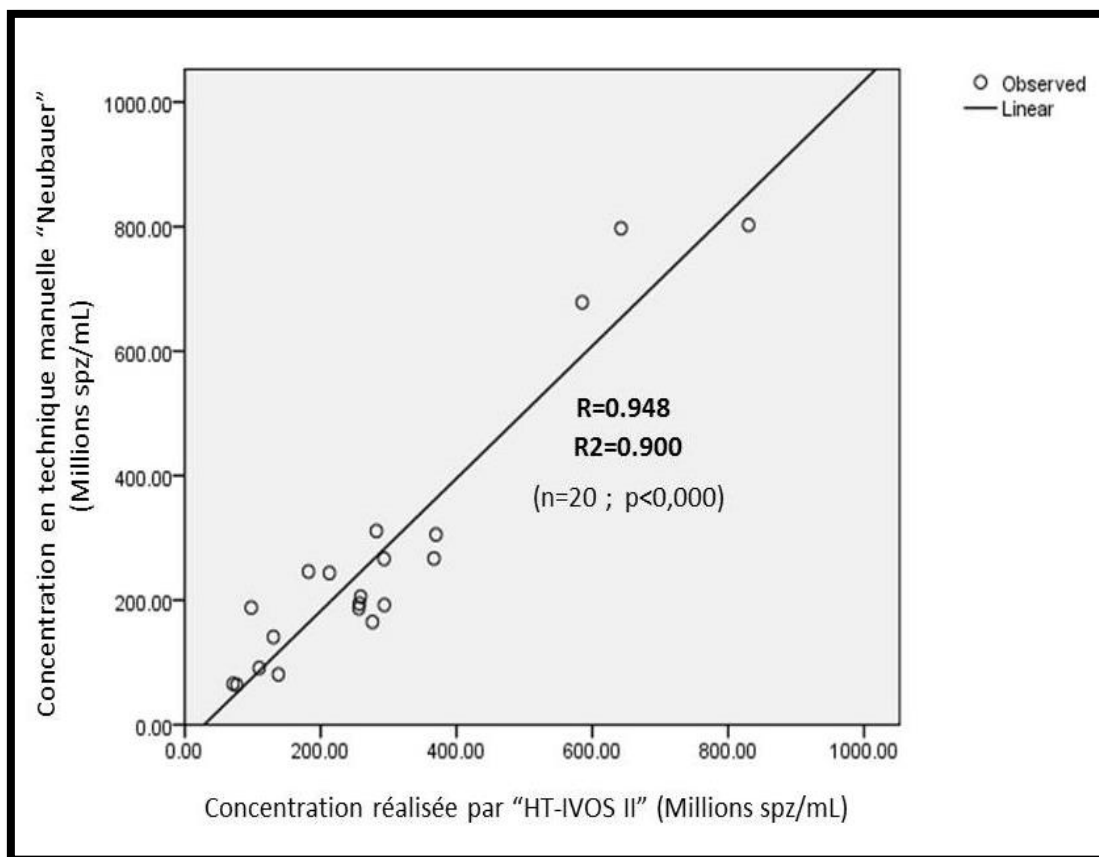


Figure n° 46 : Droite de régression linéaire entre la concentration des spz canins analysés par le système HT-IVOS II « HBM : 140 ; AREA : 6 μ m² » et la numération à la cellule de Neubauer. p=0.149 (n=20).

2.2.2.3. Corrélation entre la concentration par HT-IVOS II « HBM140A4 » et par numération « Neubauer ».

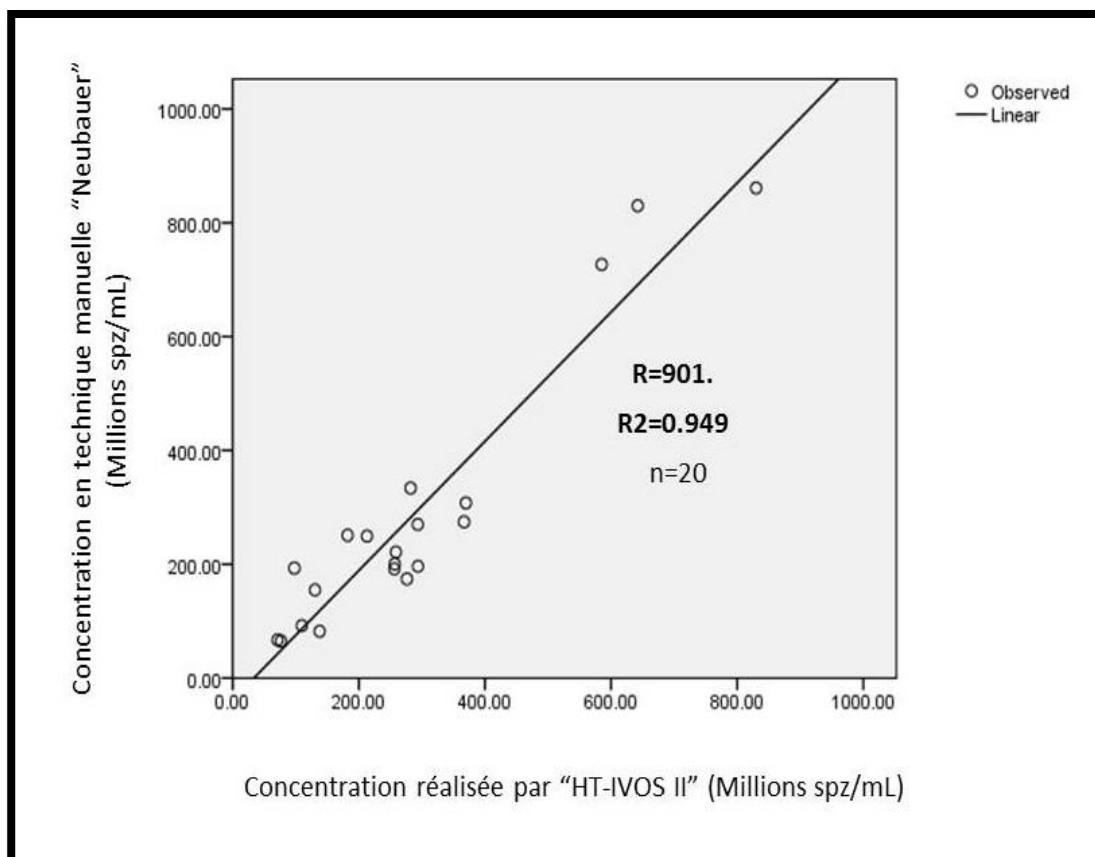


Figure n° 47 : Droite de régression linéaire entre la concentration des spz canins analysés par le système HT-IVOS II « HBM : 140 ; AREA : 4 μ m² » et la numération à la cellule de Neubauer. p=0.149 (n=20).

2.2.2.4. Corrélation entre la concentration par HT-IVOS II « HBM120A14 » et par numération « Neubauer » :

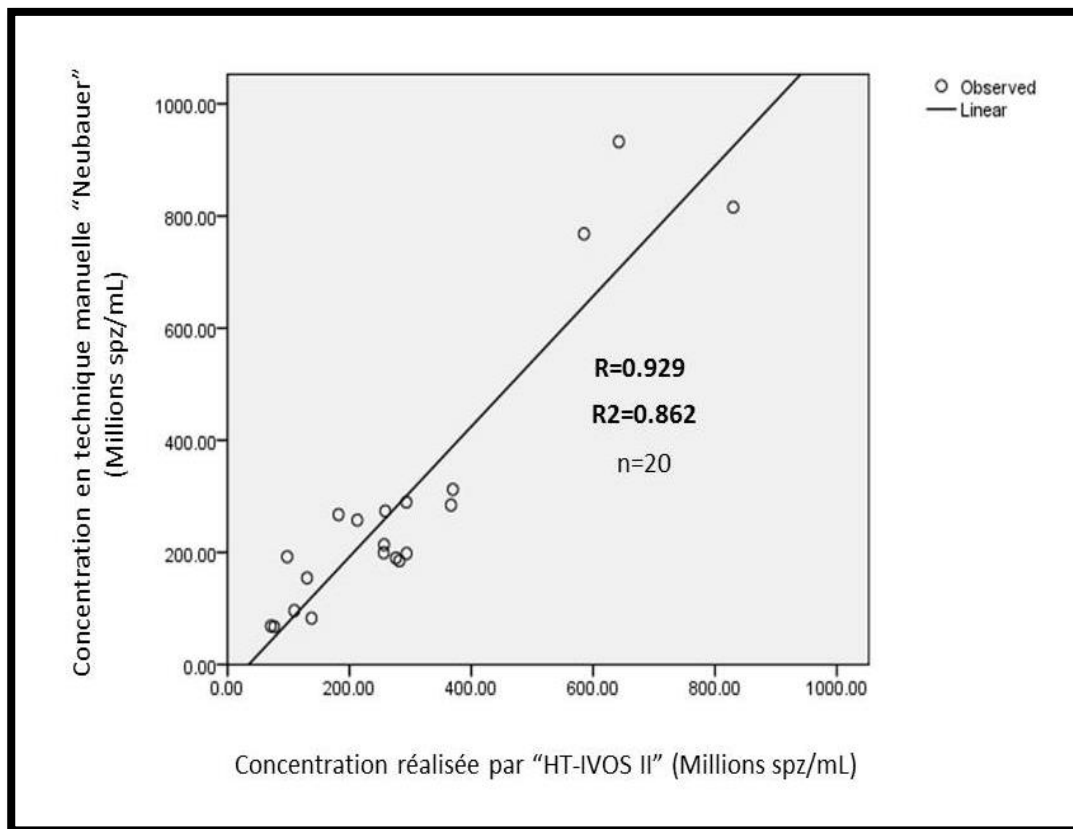


Figure n° 48 : Droite de régression linéaire entre la concentration des spz canins analysés par le système HT-IVOS II « HBM : 120 ; AREA : 4 μ m² » et la numération à la cellule de Neubauer. p=0.149 (n=20).

2.2.2.5. Corrélation entre la concentration par HT-IVOS II « HBM120A6 » et par numération « Neubauer » :

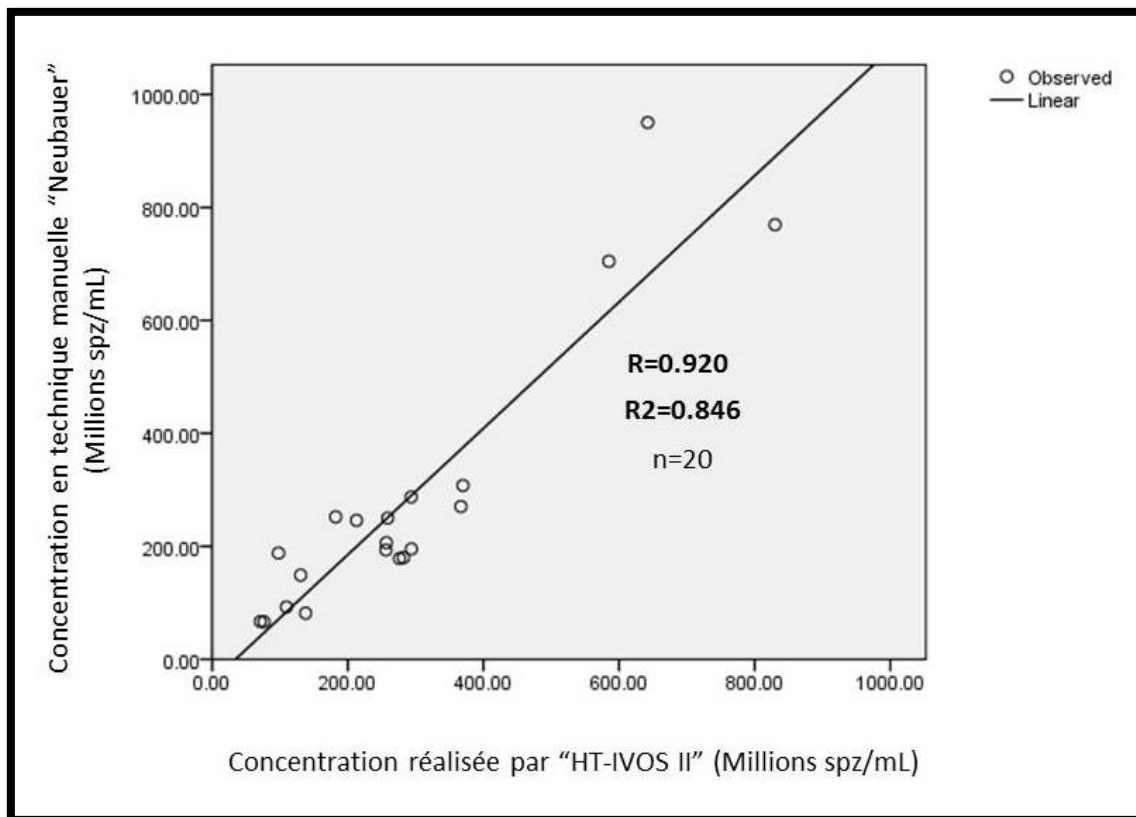


Figure n° 49 : Droite de régression linéaire entre la concentration des spz canins analysés par le système HT-IVOS II « HBM : 120 ; AREA : 6 μ m² » et la numération à la cellule de Neubauer. p=0.149 (n=20).

Tableau n° 8 : Concentration spermatique analysée par le système HT-IVOS II avec 5 paramétrages différents « HBM-AREA : 187-16, 140-4, 140-6, 120-4 et 120-6 » et la numération à la cellule de Neubauer (n=20).

Descriptive Statistics

	Mean	Std. Deviation	N
CONC.HBM187A16	19.7650	39.99382	20
CONC.HBM140A6	274.6265	222.63613	20
CONC.HBM140A4	287.1665	237.23673	20
CONC.HBM120A6	281.7895	241.14032	20
CONC.HBM120A4	292.5410	248.19334	20
CONC.NB	286.4495	198.34548	20

Tableau n° 9 : Corrélation de Pearson croisés entre la concentration des spz canins analysés par le système HT-IVOS II avec 5 paramétrages différents « HBM-AREA : 187-16, 140-4, 140-6, 120-4 et 120-6 » et la numération à la cellule de Neubauer. (n=20).

Correlations							
		CONC. HBM187A16	CONC. HBM140A6	CONC. HBM140A4	CONC. HBM120A6	CONC. HBM120A4	CONC.NB
CONC.HBM187A16	Pearson Correlation	1	.763**	.777**	.699**	.734**	.792**
	Sig. (2-tailed)		.000	.000	.001	.000	.000
	N	20	20	20	20	20	20
CONC.HBM140A6	Pearson Correlation	.763**	1	1.000**	.981**	.985**	.948**
	Sig. (2-tailed)	.000		.000	.000	.000	.000
	N	20	20	20	20	20	20
CONC.HBM140A4	Pearson Correlation	.777**	1.000**	1	.978**	.983**	.949**
	Sig. (2-tailed)	.000	.000		.000	.000	.000
	N	20	20	20	20	20	20
CONC.HBM120A6	Pearson Correlation	.699**	.981**	.978**	1	.998**	.920**
	Sig. (2-tailed)	.001	.000	.000		.000	.000
	N	20	20	20	20	20	20
CONC.HBM120A4	Pearson Correlation	.734**	.985**	.983**	.998**	1	.929**
	Sig. (2-tailed)	.000	.000	.000	.000		.000
	N	20	20	20	20	20	20
CONC.NB	Pearson Correlation	.792**	.948**	.949**	.920**	.929**	1
	Sig. (2-tailed)	.000	.000	.000	.000	.000	
	N	20	20	20	20	20	20

** . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

En résumé :

Les deux couples de paramètres « HBM140-AREA6 et HBM140-AREA4 » sont les plus fortement corrélés à la technique de référence avec des corrélations très hautement significative ($p=0.000$) et des coefficients de Pearson respectivement de 0.948 et 0.949.

Les moyennes de concentration obtenues par ces deux paramétrages sont 287,17 et 274,63 pour des écarts par rapport à la valeur de référence de 0.5 et 11,82 points respectivement.

2.2.3. Comparaison entre HT-IVOS II « setting optimisé » et photomètre « SDM » pour la mesure de la concentration par rapport à la technique de référence :

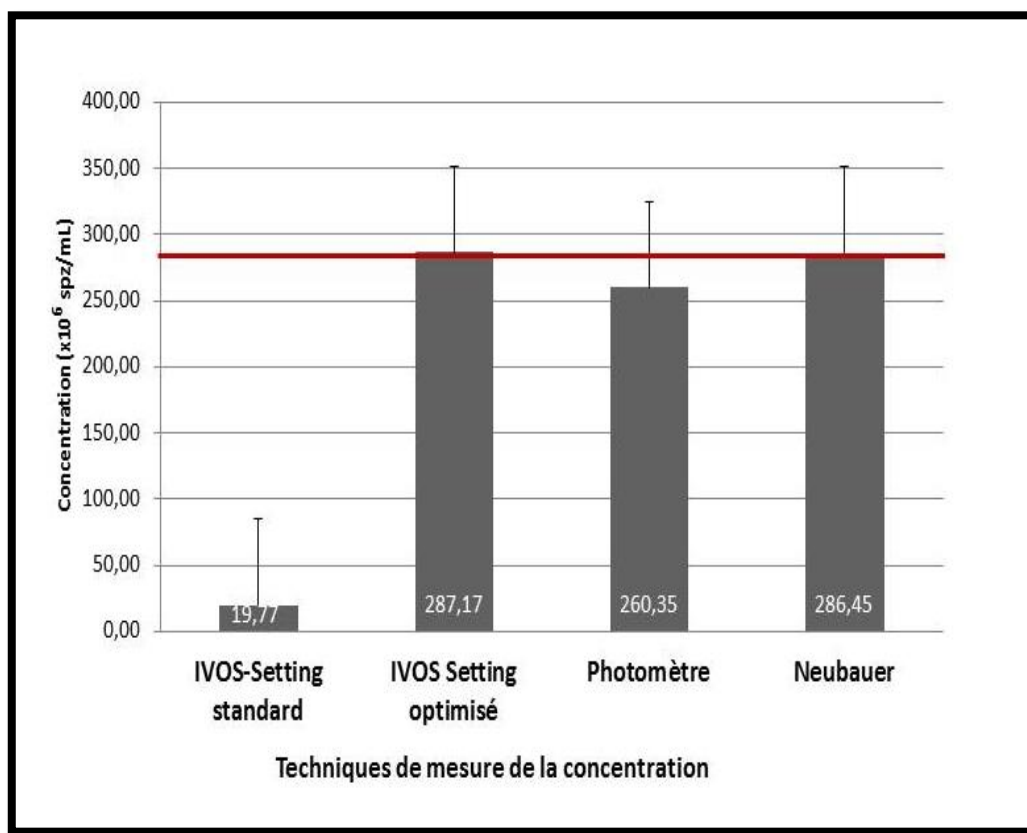


Figure n° 50 : Concentration spermatique analysée par le système HT-IVOS II « avec paramétrages standard et ajusté ; HBM-AREA : 187-16, 140-4 » le photomètre SDM calibré pour semence canine et la numération à la cellule de Neubauer (n=20).

Tableau n°10 : Corrélation de Pearson croisés entre la concentration des spz canins analysés par le système HT-IVOS II avec « 2 paramétrages standard et ajusté ; HBM-AREA : 187-16, 140-4 », le photomètre SDM calibré pour semence canine et la numération à la cellule de Neubauer (n=20).

		Corrélations			
		CONC.SDM	CONC.NB	CONC. HBM187A16	CONC. HBM140A4
CONC.SDM	Corrélation de Pearson	1	,966**	,765**	,941**
	Sig. (bilatérale)		,000	,000	,000
	N	20	20	20	20
CONC.NB	Corrélation de Pearson	,966**	1	,792**	,949**
	Sig. (bilatérale)	,000		,000	,000
	N	20	20	20	20
CONC.HBM187A16	Corrélation de Pearson	,765**	,792**	1	,777**
	Sig. (bilatérale)	,000	,000		,000
	N	20	20	20	20
CONC.HBM140A4	Corrélation de Pearson	,941**	,949**	,777**	1
	Sig. (bilatérale)	,000	,000	,000	
	N	20	20	20	20

** . La corrélation est significative au niveau 0.01 (bilatéral).

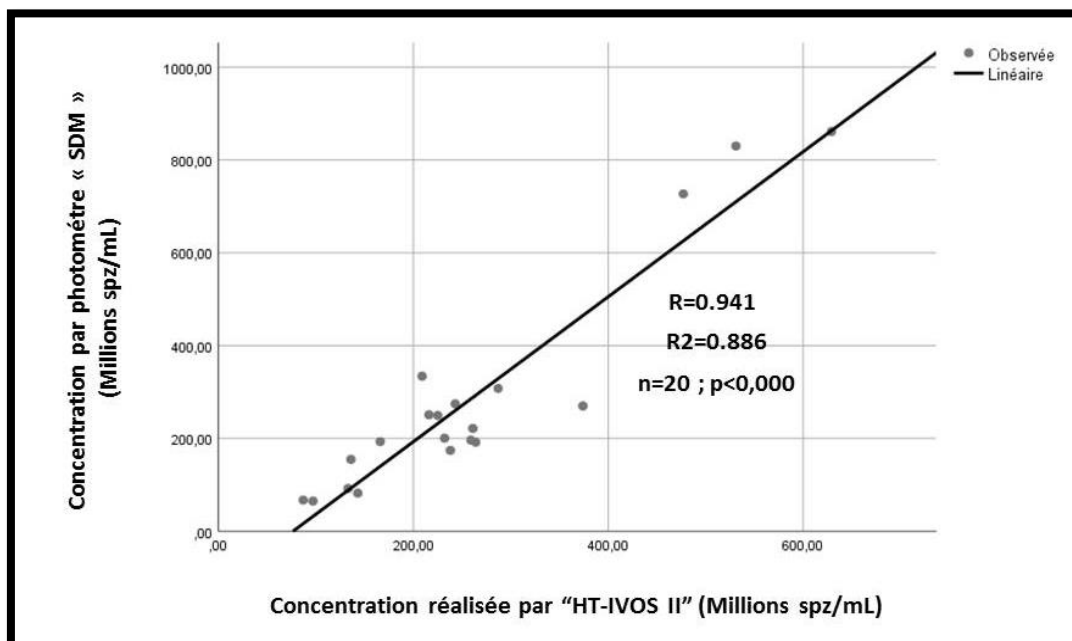


Figure n° 51 : Droite de régression linéaire entre la concentration des spz canins analysés par le système HT-IVOS II « HBM : 140 ; AREA : 4µm² » et le photomètre SDM calibré pour semence canine (n=20).

Cette étude de corrélation met ainsi en évidence une forte corrélation entre l'IVOS II ajusté et le photomètre « SDM » avec un R=0,981 et un R²= 0,886.

2.3. Effet du paramétrage de détection cellulaire sur les paramètres cinétiques :

2.3.1. Etude descriptive de l'effet des deux paramètres sur les moyennes de motilité (MOT, %) et progressivité (PROG, %) :

Tableau n°11 : Moyennes des pourcentages de motilité (MOT, %) et de progressivité (PROG, %) analysés par le système HT-IVOS II avec plusieurs paramétrages à 3 valeurs de brillance minimale « HBM : 187, 140, 120 » (HBM, n=160 ; AREA, n=180)

	N	Minimum	Maximum	Moyenne	
	Statistiques	Statistiques	Statistiques	Statistiques	Erreur standard
MOT.HBM.AREA16	160	,00	91,50	54,5206	1,75399
PROG.HBM.AREA16	160	,00	85,30	45,8256	1,82242
MOT.AREA.HBM187	180	,00	93,30	62,8122	1,43648
PROG.AREA.HBM187	180	,00	83,60	52,3900	1,47030
MOT.AREA.HBM.140	180	46,40	93,30	70,6694	,77907
PROG.AREA.HBM140	180	29,20	83,50	61,2256	,91958
MOT.AREA.HBM.120	180	38,30	92,80	68,5317	,82496
PROG.AREA.HBM120	180	24,40	84,00	59,7644	,94512
N valide (liste)	160				

2.3.2. Effet de 3 paramétrages de l'IVOS II sur les pourcentages de mobilité des spz canins :

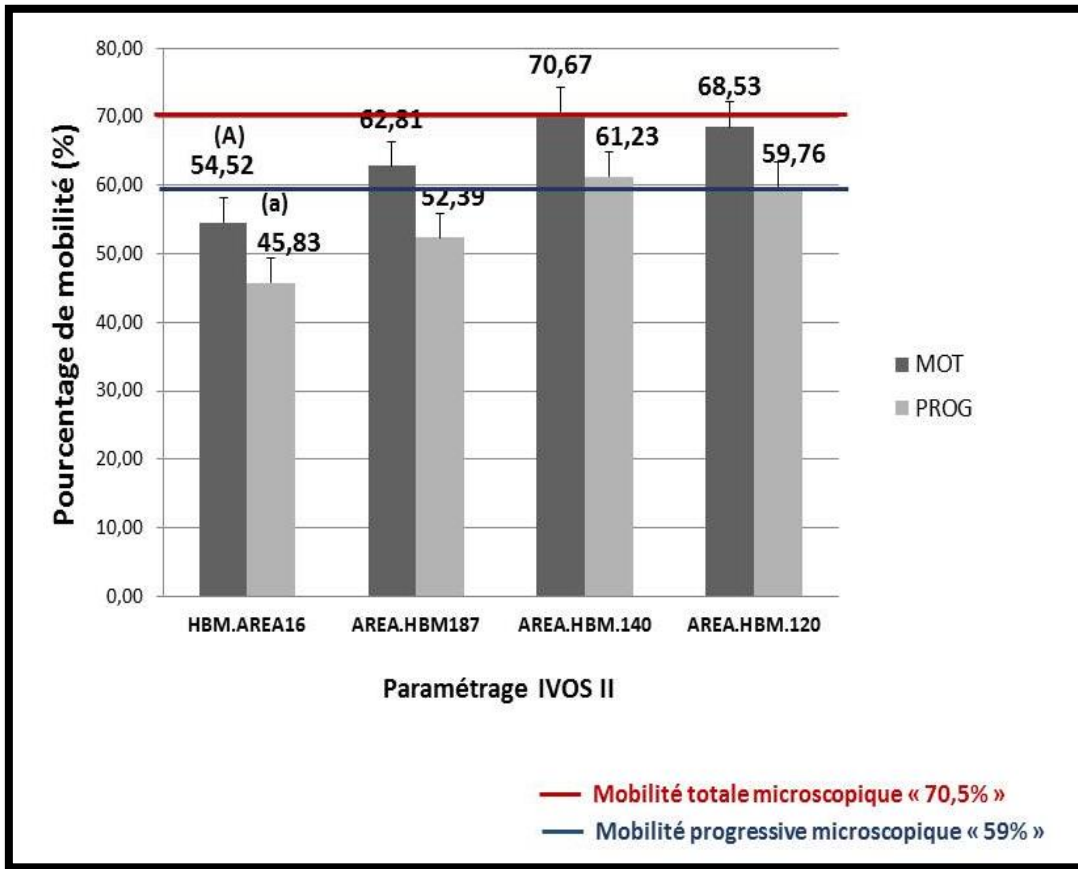


Figure n° 52 : Effet de 3 paramétrages de l'IVOS II sur les pourcentages de mobilité totale (MOT, %) et progressifs (PROG, %) des spz canins.

Cette expérience montre que les pourcentages des spz mobiles « MOT, % » et progressifs « PROG, % » analysées par HT-IVOS aux valeurs « HBM » 120 et 140 et de « AREA » 4 et 6µm² concordent avec la mobilité totale et progressive évaluée par technique classique microscopique « selon les recommandations de l'OMS (2010 & 2021) ».

3. DISCUSSION

Malgré le gain de temps, la précision et l'exactitude apporté par le système CASA dans l'analyse spermatique, cet analyseur assisté par ordinateur semble souffrir encore de plusieurs limites associées aux erreurs humaines de manipulation, de préparation et d'analyse, qui sont largement explorés dans la littérature (**Birks et al., 1994 ; Farrell et al., 1996 ; Iguer-Ouada et Versteegen, 2001, 2005 ; Rijsselaere, 2003, 2005, 2012 ; Bailley et al., 2007 ; Dorado et al., 2011 ; Vanderhost et al., 2014**). En plus de ces facteurs, il existe d'autres dits analytiques, comme l'inadéquation du paramétrage « setting » technique du logiciel d'analyse d'image (Setting préétabli du logiciel d'analyse d'image) qui représente également une source d'erreur, n'ayant malheureusement pas fait l'objet de beaucoup d'études dans la littérature (**Siminiki et al., 2015 ; O'meara et al., 2021**).

En effet, si le système CASA possède une fiabilité largement acceptée dans l'analyse de la mobilité, il n'en est pas de même pour la mesure de la concentration, où les valeurs obtenues sont souvent surestimées ou sous-estimées comparée à la numération microscopique considérée toujours comme la technique de référence par l'OMS.

Notre hypothèse est qu'une optimisation du paramétrage de détection cellulaire est à même de corriger les erreurs dans la mesure de la concentration des spz canins par le système HT-IVOS II.

Pour ce faire, une étude préliminaire, conduite dans notre laboratoire, au moyen de la fonction « auto-configuration » du système IVOS II sur trois éjaculats, a permis de mettre en évidence l'effet de deux paramètres de détection cellulaire à savoir la brillance (contraste) et la taille (AREA, μm^2) minimales de la tête du spermatozoïde sur la capacité du système à détecter ces cellules.

Pour la brillance minimale de la tête du spermatozoïde « HBM », la valeur recommandée par le fabricant étant de 187 pour la détection du spz canin et 180 pour le spz bovin et équin. Récemment, la valeur de 168 a été recommandée pour le spz bovin congelé par O'meara et ses collaborateurs (**O'meara et al. 2021**).

Quant à la taille minimale de la tête du spermatozoïde « AREA », encore appelée aire ou surface, exprimée en μm^2 ; elle est calculée comme l'aire d'une ellipse qui est la forme la plus proche à la tête du spermatozoïde. Elle est égale au produit des deux axes (petit et grand) de l'ellipse multiplié par 3.14 (π). Contrairement à la brillance qui est une notion physique, l'aire « AREA » est une mesure de distance ou de taille de la tête du spermatozoïde. La valeur

minimale de la taille définit le seuil de détection par le logiciel d'analyse d'image. La valeur recommandée par le fabricant qui est de $16\mu\text{m}^2$.

Cette étude préliminaire suggère que le paramétrage de détection cellulaire recommandé par le fabricant (IMV-Technologies) est très critiquable, car associé visiblement à une mauvaise détection conduisant surtout à une sous-estimation de la concentration. Ceci soulève l'intérêt d'explorer de plus près ces deux paramètres de détection cellulaire en vue de les optimiser pour l'analyse des spz canin par le système HT-IVOS II.

Etude et optimisation des paramètres de détection cellulaire

Selon le paramètre de brillance « HBM », et à lui seul, l'optimum serait de 120, car cette valeur ($201,58 \times 10^6$ spz/mL) est la plus proche de la concentration évaluée par la technique de référence ($286,45 \times 10^6$ spz/mL). Cependant, vu que cette valeur de brillance est obtenue en fixant le paramètre taille minimale de la tête du spz « AREA » à la valeur de $16\mu\text{m}^2$ recommandée par le fabricant, et en admettant hypothétiquement que ces deux facteurs peuvent avoir une interaction, la valeur optimale de brillance pour une taille de $16\mu\text{m}^2$ ne serait peut-être pas optimale pour une autre valeur de AREA. Il est donc très utile d'étudier l'interaction de ces deux facteurs.

Il est à souligner que la valeur recommandée par le fabricant (187) dans le setting pour les spz canins est, dans les conditions de notre travail, tout à fait inadaptée, car associée à une valeur de concentration ($19,77 \times 10^6$ spz/mL) très éloignée de celle obtenue par la technique de référence ($286,45 \times 10^6$ spz/mL).

Très récemment, O'meara et ses collaborateurs (O'meara et al., 2021) ont publié un travail sur l'ajustement du setting de l'HT-IVOS II dans l'évaluation de la concentration, mobilité et morphologie des spz bovins congelés, Bien que leur objectif était l'optimisation du paramétrage cinématique et non de détection cellulaire, ses auteurs ont ajusté le paramètre brillance minimale de la tête (HBM) à la valeur de 168 en partant de la valeur 180 dans le setting de départ (O'meara et al., 20212). Notre résultat semble corroborer celui de ces auteurs dans le sens de remettre en cause l'adaptation de la valeur de brillance recommandé par le fabricant dans le setting standard (180 pour bovin ; 187 pour chien). Cependant, nos résultats divergent de ceux de O'meara et ses collaborateur par rapport à la valeur de 168 recommandée dans leur étude et qui dans les conditions de notre travail, ne semble pas donner satisfaction.

En effet, pour des raisons de commodité pratique de notre protocole expérimental et sur la base des résultats préliminaires (non montrées), le facteur HBM a été varié dans un intervalle de 100-200 par palier de 20 point. Donc la valeur la plus proche de 167 étant 160 et elle a permis

d'obtenir une concentration de 59,55 millions spz/mL qui s'écarte considérablement de la valeur de référence (286,45 millions/mL).

Enfin, après étude du premier facteur qui est la brillance minimale de la tête (HBM), ayant favorisé comme optimum la valeur de 120, il serait plus judicieux d'évaluer la variation du deuxième paramètre de détection cellulaire en l'occurrence la taille minimale de la tête du spz canin « AREA ».

La taille minimale de la tête du spermatozoïde canin analysée séparément dans la classe HBM 120 et HBM 140 ne donnent statistiquement aucune DS ($p=0.802$; $p=0,149$ respectivement) entre les différentes valeurs de AREA « 2-16 » et la valeur de concentration obtenue par la technique de référence.

Cependant, il est aisément observable que les valeurs les plus proches de la technique de référence sont celles de 4 et 6 μm^2 avec respectivement des concentrations de 292, 54 et 281,79 pour HBM 120 et 287,17 et 274,63 pour HBM 140 par rapport à la valeur de référence de 286,45 millions spz/ml, avec respectivement 6,09 et 4,66 millions d'écarts pour HBM 120 et 0,5 et 11,83 millions spz d'écarts. Il est donc à retenir que la valeur optimale d'AREA est 4 μm^2 pour HBM 120 et 6 μm^2 pour HBM 140.

Par ailleurs, la valeur d'AREA recommandée par le fabricant (16 μm^2) a permis d'obtenir les valeurs de concentration les plus éloignées de la valeur de référence à savoir 201,58 et 135,16 millions Spz/ml respectivement pour HBM 120 et HBM 140 avec 84,87 et 151,29 millions Spz/ml d'écarts respectifs.

Il est à souligner que cette valeur du paramètre taille minimale de la tête (Area) est associée à une importante sous-estimation de la concentration qui est accentuée par le paramétrage de la brillance minimale de la tête.

La valeur de 16 μm^2 comme seuil minimal de la taille de la tête du Spz canin (AREA), recommandée par le fabricant « IMV-Technologies Setup CANIN IVOS II IMV 20180216 voir annexe **Figure n° 36**, a permis d'obtenir la concentration la plus éloignée de la valeur de référence (199,55 vs. 286,45 millions Spz/ml). Ce résultat était prévisible car cette valeur est très critiquable pour être surestimée et ce deux points de vue à savoir nos observations personnelles au laboratoire et les études antérieures dans la littérature.

En effet, dans le cadre de notre expérimentation, lorsque ce paramètre a été réglé au plus bas possible, soit 2 μm^2 , les valeurs morphométriques (dont AREA, μm^2) générées systématiquement par notre système HT-IVOS II grâce à son programme d'analyse automatique de morphologie (sans coloration) et consultables en play-back sur les photos capturées et analysées, montrent que beaucoup de spermatozoïdes canins détectés en tant que

tels par le système IVOS II ont des valeurs mesurées de (AREA) inférieures à $16 \mu\text{m}^2$. Ces observations se sont répétées tellement de fois qu'il était devenu presque évident que ce seuil de $16 \mu\text{m}^2$ est trop élevé et qu'il mérite d'être optimisé.

De plus, différemment du paramètre de brillance de la tête du spz canin qui est une notion purement physique en relation avec l'intensité d'illumination et le contraste de phase, la taille de la tête du spz est une entité morphométrique qui devrait être définie par des explorations sur les spermatozoïdes de chiens fertiles. Ainsi, plusieurs valeurs ont été rapportées dans la littérature à savoir $5 \pm 2 \mu\text{m}^2$ avec un intervalle de $2-11 \mu\text{m}^2$ (Iguer-Ouada et Verstegen, 2001), $8 \mu\text{m}^2$ (Rijsselaere et al., 2005) et 6 pixel (Domoslawska et al., 2013 ; Belala et al., 2016). Ainsi, aucun auteurs, à la limite de notre connaissance n'a rapporté ou utilisé une valeur aussi élevée que $16 \mu\text{m}^2$ comme un seuil minimal de détection dans un système CASA. La conséquence d'un tel paramétrage est le rejet par le système de tous les spz qui ont une aire (AREA) de moins de $16 \mu\text{m}^2$.

Etude de corrélation entre l'IVOS II et la technique de référence « Neubauer »

Etant donné que l'analyse de variance ne semble pas montrer de différence significative ($p=0.803$) entre les valeurs évaluées "2-16" du paramètre AREA (HBM187) et la valeur de numération "Neubauer" incluse, malgré les grands écarts observés entre ces valeurs, il serait à conclure que l'ANOVA n'est pas le test approprié dans cette situation, car il existe à la base de grands écarts entre les valeurs à l'intérieur des groupes comparés et le test est donc peu sensible aux écarts entre ces groupes d'où la DNS. Dans ce cas-là, il faudra appliquer des tests de corrélation qui vont comparer les données par paire sur une droite de corrélation.

Cette étude de corrélation a montré que les deux couples de paramètres « que l'on appellera paramétrages » les plus fortement corrélés à la technique de référence sont donc HBM140A6 et HBM140A4 avec des corrélations très hautement significative ($p=0.000$) et un coefficient de Pearson de (0.948) et (0.949) respectivement. Ce dernier paramétrage a permis d'obtenir une concentration qui se superpose parfaitement à la valeur de référence avec 0.5 point d'écart. Il semble, dans les conditions de notre travail, le setup optimal à recommander pour la meilleure détection cellulaire des spermatozoïdes canin frais en milieu clair par le système HTR IVOS II.

Comparaison entre HT-IVOS II « setting optimisé » et photomètre « SDM »

Dans certains laboratoires et centres de reproduction canine, où le système CASA ne peut être utilisé comme moyen fiable de mesure de la concentration, le recours au photomètre pour analyse rapide est inévitable, notamment en clientèle d'IA ou contrôle initial de la semence comme condition d'inclusion ou d'exclusion de la recherche.

Dans de telles conditions, la numération cellulaire au moyen d'un hématimètre serait contraignante et chronophage, notamment si l'on doit l'effectuer exactement comme recommandé dans le manuel d'OMS 2010 pour le laboratoire d'analyse spermatique.

Grâce à l'ajustement du setting de détection cellulaire effectué, l'analyseur IVOS II a pu donner une valeur moyenne de concentration beaucoup plus proche de la technique de référence que le photomètre qui s'écarte de la technique gold standard de 26 millions alors que l'IVOS avec paramétrage ajusté n'en a que 0,5 d'écart.

L'étude de corrélation qui a déjà montré dans la partie précédente que l'IVOS avec paramétrage ajusté se corrèle parfaitement avec la technique de référence « Numération Neubauer », elle met en évidence ici une forte corrélation entre l'IVOS II ajusté et le photomètre « SDM » avec un $R=0,981$ et un $R^2= 0,886$.

Effet du paramétrage de détection cellulaire sur les paramètres cinétiques.

Une parfaite concordance a été enregistrée entre la mobilité totale et progressive évaluée par technique classique microscopique « selon les recommandations de l'OMS (2010 & 2021) » et respectivement les pourcentages des spz mobiles « MOT, % » et progressifs « PROG, % » analysées par HT-IVOS aux valeurs 120 et 140 de brillance « HBM » et de 4 et 6% m^2 de taille minimale de la tête « AREA » du spz canin. Ceci est en concordance avec nos résultats sur la concentration qui sont en faveur de ces mêmes valeurs de HBM et Area.

Cet effet établi des paramètres de détection cellulaire « HBM et AREA » sur l'analyse cinétiques effectuée par l'HT-IVOS II confirme notre hypothèse de départ qui stipule que le système CASA doit avoir une bonne détection cellulaire « concentration » pour pouvoir analyser avec précision et exactitude la mobilité.

En effet, une mauvaise détection cellulaire ne se retentit pas uniquement sur la mesure de la concentration, mais aussi sur l'analyse de mobilité, Ceci pourrait s'expliquer par les éléments suivants :

- ✓ Les erreurs de détection cellulaire par excès lors d'utilisation de seuils trop bas ou par défaut lors de seuils trop élevés de la taille minimale « AREA » ou de la brillance minimale « HBM » de la tête du spz conduisent à une surestimation de la concentration des Spz dans le premier cas et une sous-estimation dans le deuxième. Ceci dit que les Spz détectés, à cause des erreurs par en excès et par défaut, ne sont plus représentatif des champs microscopiques dans lesquels ils ont été analysés « le principe de répartition homogène des spermatozoïdes dans une suspension cellulaire n'est plus respecté ».

- ✓ Il en résulte des erreurs de concentration mais aussi et inévitablement des erreurs dans les proportions de mobilité analysées.
- ✓ Si le système détecte des objets inanimés « granules ayant la taille d'une tête de Spz » comme étant des Spz, ils vont sans doute surestimer la population des Spz statiques.
- ✓ Si par contre le système ne détecte pas tous les Spz qui sont dans les champs analysés et délimités comme étant un volume calculés de la chambre d'analyse, il va baser son analyse sur des sous populations qui ne sont plus réparties de façon homogène.

Il est donc à retenir que le paramétrage de détection cellulaire a un effet certain sur les paramètres cinétiques générés par le système HT-IVOS II. Cependant, le contraire n'étant pas vrai, le paramétrage cinétique de l'IVOS ne semble avoir aucun effet sur le paramètre concentration. Ceci a été constaté dans notre étude, lors de la deuxième partie consacrée à un essai d'optimisation du paramétrage cinétique « seuils de VSL, VAP et STR » et l'évaluation de plusieurs settings. Ce constat est en accord avec ce qui a été rapporté dernièrement par O'meara et ses collaborateurs pour les Spz bovins congelés (**O'meara et al. 2021**).

CONCLUSION :

A l'issue de ce travail, il est à conclure ce qui suit :

Le paramétrage technique du système HT-IVOS II et notamment celui de la détection cellulaire influence significativement les résultats de mesure de la concentration spermatique et également l'analyse cinétique des spermatozoïdes canins.

Le système IVOS détecte la tête du spermatozoïde grâce d'abord à sa brillance ou contraste par rapport au fond puis grâce la taille de la tête. Ainsi, les seuils « minimum » prédéfinis de la brillance « MHB » et de la taille « AREA, μm^2) de la tête du spermatozoïde sont les facteurs les plus impactant dans la détection cellulaire.

Les valeurs optimales de brillance « HBM » et de taille « AREA » de la tête permettant la meilleure détection cellulaire des spermatozoïdes canins par le système HT-IVOS II sont :

- HBM : 140.
- AREA : 4 μm^2 .

Grâce à cet ajustement du paramétrage de détection, le système HT-IVOS serait une bonne alternative à la technique de référence « Numération à la cellule de Neubauer » dans l'évaluation de la concentration spermatique et aussi à un photomètre « SDM » calibré pour semence canine. Le système IVOS II pourrait ainsi être utilisé dans la calibration « étalonnage » des photomètres de paillasse utilisés couramment dans les laboratoires et les centres d'insémination artificielle canine. Il offre ainsi un gain de temps et d'effort par rapport à la Numération cellulaire.

Le paramétrage de détection cellulaire « HBM et AREA » a un effet significatif sur les pourcentages des spermatozoïdes mobiles (MOT, %) et progressifs (PROG, %) ainsi que les paramètres cinétiques « VCL, VSL, VAP, LIN, STR, WOB, ALH, BCF » évalués par le système HT-IVOS II. L'ajustement proposé «HBM: 140 et AREA: 4 μm^2 » a permis d'obtenir les valeurs de MOT% et de PROG% les plus proches des pourcentages de mobilité totale et progressive évaluée classiquement par microscopie optique, même si la corrélation entre les deux techniques restent très faible.

RECOMMANDATIONS :

A l'issue de ce travail, il est à recommander ce qui suit :

- Affiner l'optimisation du paramétrage de détection cellulaire sur des intervalles de brillance « HBM » et de taille « AREA » minimale de la tête, respectivement de 100-140 et 4-12 μm^2 et en faisant varier ces paramètres par paliers de 5 à 10 points.
- Effectuer l'optimisation du paramétrage de détection cellulaire du système IVOS II dans l'analyse des spermatozoïdes d'autres animaux dont essentiellement le bovin et l'équin.
- Etudier l'effet et optimiser les autres paramètres de détection cellulaire à savoir :
 - ✓ Taille maximale de la tête (AREA max, μm^2).
 - ✓ Elongation de la tête « Max. et Min. ».
 - ✓ Brillance minimale du flagelle.
- Etendre l'optimisation du paramétrage cinématique du système HT-IVOS II en évaluant d'autres changements du setting et en augmentant l'ordre de changement du setting jusqu'à avoir des différences significatives.

BIBLIOGRAPHIE

- Bailey E, Fenning N, Chamberlain S, Devlin L, Hopkisson J, Tomlinson M. Validation of sperm counting methods using limits of agreement. *J Androl.* 2007;28(3):364-73. <http://dx.doi.org/10.2164/jandrol.106.002188>. PMID:17215545.
- Barone R. Anatomie comparée des mammifères domestiques : appareil uro-génital, foetus et ses annexes, péritoine et topographie abdominale. Paris, France : Ed. Vigot ; 2001.
- Belala R, Briand-Amirat L, Vinciguerra L, Tainturier D, Kaidi R, Thorin C, Michaud S, Anton M, Bencharif D (2016) Effect of equilibration time on the motility and functional integrity of canine spermatozoa frozen in three different extenders. *Res Vet Sci* 106:66–73
- Bioforma 2009.cahier de formation Bioforma N°42 Exploration de la fonction de reproduction, versant masculin, 2009)
- Birks AG, Izzard H, Morroll DR, Prior JR, Troup SA, Lieberman BA, Matson PL. The routine assessment of sperm motility at room temperature and 37 degrees C. *Int J Androl.* 1994;17(6):289-91. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2605.1994.tb01258.x>. PMID:7744507.
- Blonz O. Techniques d'examen du sperme du chien (étude bibliographique) [Thèse d'exercice]. [Nantes, France] : Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes ; 1989.
- Boryshpolets S, Kowalski RK, Dietrich GJ, Dzyuba B, Ciereszko A. Different computer-assisted sperm analysis (CASA) systems highly influence sperm motility parameters. *Theriogenology.* 15 oct 2013 ; 80(7) : 758-65.
- Cunningham JG, Klein BG. *Cunningham's Textbook of Veterinary Physiology.* Elsevier/Saunders ; 2013.
- Daub L, Geyer A, Reese S, Braun J, Otzdorff C. Sperm membrane integrity in fresh and frozen– thawed canine semen samples: a comparison of vital stains with the Nucleo Counter SP-100. *Theriogenology.* 2016 ; 1(6).
- Delay J. Intérêts des liposomes dans la réfrigération du sperme canin [Thèse d'exercice]. [Nantes, France] : Oniris - Ecole Nationale Vétérinaire Agroalimentaire et de l'Alimentation ; 2014.
- Dumon C (2007) Insémination Artificielle Dans L'Espèce Canine : Actualités. *Bull Acad Vét Fr* 160:133–

- Farrell PB, Foote RH, McArdle MM, Trouern-Trend VL, Tardif AL. Media and dilution procedures tested to minimize handling effects on human, rabbit, and bull sperm for computer-assisted sperm analysis (CASA). *J Androl.*1996;17(3):293-300. PMID:8792220.
- FDAILAINNE Cherifa PFE Comparaison entre deux techniques : méthode classique d'énumération avec une méthode automatisée par le sperm class analyser (SCA) 2017
- Feldman EC, Nelson RW (1996) *Canine and feline endocrinology and reproduction.* W.B. Saunders Co
- Fontbonne A, Fontaine E, Gilson C, Lévy X (2007) *Guide pratique de reproduction clinique canine et féline.* Med'Com
- Fontbonne A, Fontaine E, Gilson C, Lévy X (2007) *Guide pratique de reproduction clinique canine et féline.* Med'Com
- FONTBONNE A. (1992) Physiologie sexuelle du chien mâle. In :PagesJ.P.(eds.).*Les indispensables de l'animal de compagnie. Reproduction du chien et du chat.* PMCAC Edition, Paris, 19-26.
- FONTBONNE A. (1995) Infécondité du chien mâle. In : *Encyclopédie vétérinaire. Pathologie de la reproduction.* Elvesier, Paris, Volume 5, 1-13.
- FONTBONNE A. (1995) Infécondité du chien mâle. In : *Encyclopédie vétérinaire. Pathologie de la reproduction.* Elvesier, Paris, Volume 5, 1-13.
- FONTBONNE A., DUMONT C. (1992) Prélèvement et examen de la semence chez le chien. In : Pages J.P. (eds.).*Les indispensables de l'animal de compagnie. Reproduction du chien et du chat.* PMCAC Edition, Paris, 251-260.
- FONTBONNE A., DUMONT C. (1992) Prélèvement et examen de la semence chez le chien. n : Pages J.P. (eds.).*Les indispensables de l'animal de compagnie. Reproduction du chien et du chat.* PMCAC Edition, Paris, 251-260.
- G van der Horst, L Maree - *Molecular reproduction and ... , Sperm form and function in the absence of sperm competition* 2014 - Wiley Online Library
- Guigardet V. Contribution à l'évaluation du pouvoir fécondant du sperme de chien : emploi d'un colorant de l'acrosome : le SPERMAC* [Thèse d'exercice]. [France] : Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon ; 1997.
- Gürtler H, Kolb E, Labie C, Michelat J. *Physiologie des animaux domestiques.* Vigot Frères ; 1975.
- Iguer-Ouada M, Verstegen J. (2001) Evaluation of the "Hamilton thorn computer-based automated system" for dog semen analysis. *Theriogenology* 55:733–749

- Iguer-ouada M, Verstegen JP. Evaluation of the « Hamilton Thorn computer-based automated system » for dog semen analysis. *Theriogenology*. 1 févr 2001 ; 55(3) : 733-49.
- Iguer-Ouada, Verstegen JP, Onclin K, M (2005) Long-term motility and fertility conservation of chilled canine semen using egg yolk added Tris-glucose extender: In vitro and in vivo studies. *Theriogenology* 64:720–733
- J. Dorado, T. Rijsselaere, A. Muñoz-Serrano, and M. Hidalgo, Influence of sampling factors on canine sperm motility parameters measured by the Sperm Class Analyzer Systems Biology in Reproductive Medicine, 2011, 57: 318–325 Copyright © 2011 Informa Healthcare USA, Inc. ISSN 1939-6368 print/1939-6376 online DOI: 10.3109/19396368.2011.627081
- Jeyendran RS, Ven HHV der, Zaneveld LJD. The Hypoosmotic Swelling Test : An Update. *Arch Androl*. 1 janv 1992 ; 29(2) : 105-16.
- Johnston SD, Root Kustritz M, Olson PS (2001) Canine and feline theriogenology. Saunders
- Johnston SD, Root Kustritz M, Olson PS (2001) Canine and feline theriogenology. Saunders
- Joni L. Freshman (2002) Semen Collection and Evaluation. *Clin Tech Small Anim Pract* 17:104–107
- Kutzler MA (2005) Semen collection in the dog. *Theriogenology* 64:747–754
- la revue de police article Brigade canine juin 2017
- Linde-Forsberg C (1991) Achieving canine pregnancy by using frozen or chilled extended semen. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 21:467–485
- Lucie POST Validation de méthode du CASA (Computer-Aided Sperm Analysis) Hamilton Thorne CEROS II pour son application en routine dans un laboratoire de spermologie 2019
- Maes, D., Rijsselaere, T., Vyt, P., Sokolowska, A., Deley, W., Van Soom, A. (2010) Comparison of five different methods to assess the concentration of boar semen. *Vlaams Dierg Tijds* 79:42–47.
- Manandhar G, Sutovsky P. Comparative Histology and Subcellular Structure of Mammalian Spermatogenesis and Spermatozoa. In : Schatten H, Constantinescu GM, éditeurs. *Comp Reprod Biol*. Oxford, UK : Blackwell Publishing Ltd ; 2007. p. 81-98.

- Mialot J-P, Begon D, Guérin C. Pathologie de la reproduction chez les carnivores domestiques. Éditions du Point Vétérinaire ; 1984.
- Mimouni P, Dumon C. Vade-mecum de pathologie de la reproduction chez le chien. Éd. Med'com ; 2005.
- Mortimer D, Mortimer ST. Influence of system parameter settings on human sperm motility analysis using CellSoft. Hum Reprod. 1988 Jul;3(5):621–5.
- Noakes DE, Parkinson TJ, England GCW. Veterinary reproduction and obstetrics. 9th ed. Edinburgh : Saunders ; 2009.
- O'Meara C, Henrotte E, Kupisiewicz K, Latour C, Broekhuijse M, Camus A, Gavin-Plagne L, Sellem E. The effect of adjusting settings within a Computer-Assisted Sperm Analysis (CASA) system on bovine sperm motility and morphology results. Anim Reprod. 2022;19(1):e20210077. <https://doi.org/10.1590/1984-3143-AR2021>
- Oettle E. Using a new acrosome stain to evaluate sperm morphology. Vet Med USA. 1986 ;
- Ott R, Goffaux M, Thibier M. Examen morphologique des spermatozoïdes. El Ins. 1987 ; 221 : 15-20.
- Piérard J. Anatomie appliquée des carnivores domestiques : chien et chat. Maloine ; 1972.
- PRINS G.S. (1998) Semen. In : Knobil E., Neill J.D. (eds.) Encyclopedia of reproduction. Volume 4. Academic press, San Diego, 360-367.
- Rijsselaere T, Ann Van Soom, Dominiek Maes, Wojciech Nizański Computer-Assisted Sperm Analysis in Dogs and Cats: An Update after 20 Years December 2012 Reproduction in Domestic Animals 47 Suppl 6(s6):204-7 DOI:10.1111/rda.12057 SourcePubMed
- Rijsselaere T, Van Soom A, Hoflack G, Maes D, de Kruif A. Automated sperm morphometry and morphology analysis of canine semen by the Hamilton-Thorne analyser. Theriogenology. 1 oct 2004 ; 62(7) : 1292-306.
- Rijsselaere T, Van Soom A, Tanghe S, Coryn M, Maes D, De Kruif A (2005) New techniques for the assessment of canine semen quality: A review. Theriogenology 64:706–719
- Rijsselaere, T. (2004). New techniques for canine semen assessment and characterization of the sperm reservoir in the bitch. Ghent University. Faculty of Veterinary Medicine, Merelbeke, Belgium.

- Ruckebusch Y, Phaneuf L-P, D.) RD (Ph. Physiology of Small and Large Animals. B.C. Decker ; 1991.
- Schatten H, Constantinescu GM (2007) Comparative reproductive biology. Blackwell Pub
- Schubert B ,Mélanie Badiou, André Force, Computer-aided sperm analysis, the new key player in routine 2018.sperm assessment
- Simonik O, Sichtar J, Krejcarkova A, Rajmon R, Stadnik L, Beran J, Dolezalova M, Biniova Z. Computer assisted sperm analysis—the relationship to bull field fertility, possible errors and their impact on outputs: a review. Indian J Anim Sci. 2015;85:3-11.
- Tahloult Mouloud.Slamani Liza.Haffad Yamina PFE Etude comparative entre trois méthodes d'évaluation de la concentration spermatique chez le chien.2019
- Thibault C, Levasseur M-C. La reproduction chez les mammifères et l'homme. Paris : INRA : Ellipses ; 2001.
- Thibaut C, Levasseur MC (2001) La reproduction chez les mammifères et l'homme.Institut national de la recherche agronomique
- Vaissaire J, Secchi J, Hunt A. Sexualité et reproduction des mammifères domestiques et de laboratoire. Maloine ; 1977.
- Vernon DD, Johnson JE, Houwing AM, Higdon III HL, Boone WR. Accu-Beads as a quality control measure for manual and automated methods of measuring sperm concentration—an observational study. J Assist Reprod Genet. 2014 Jan;31(1):25–33.
- Veyer E (2002) Congélation de la semence dans l'espèce canine : effets de la concentration en spermatozoïdes, du volume des paillettes et de la température de décongélation sur la qualité de la semence après décongélation. Thèse. Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon. 63 p.
- Vinciguerra L. Etude comparative des différents temps d'équilibration au cours du phénomène de congélation de la semence canine [Thèse d'exercice]. [Nantes, France] : Oniris - Ecole Nationale Vétérinaire, Agroalimentaire et de l'Alimentation ; 2015.
- World Health Organization, 2010 (OMS 2010). WHO laboratory manual for the Examination and processing of human semen “FIFTH EDITION”. 978 92 4 154778 9,NLM classification: QY 190, 271p.
- Zeleznik AJ, Knobil E (2015) Physiology of reproduction : volume 1. Elsevier