

**PARTIE**  
**BIBLIOGRAPHIQUE**

**MATERIEL**  
**&**  
**METHODES**

**RESULTATS**  
**&**  
**DISCUSSION**

# **CONCLUSION**

# **INTRODUCTION**

**REFERENCES**  
**BIBLIOGRAPHYQUE**

République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université BLIDA -1- « SAAD DAHLAB »



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie  
Département de Biologie des Populations et Organismes

Mémoire de Fin d'Etudes en Vue de l'Obtention du Diplôme de  
Master en Biologie Option : Reproduction Animale

*Thème*

*Comparaison entre deux techniques : méthode classique  
d'énumération avec une méthode automatisée par le sperm class  
analyser (SCA).*

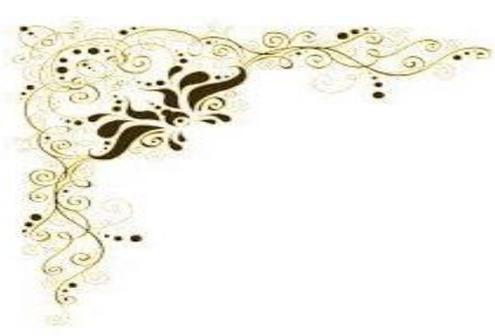
*Présenté par : Mlle FDAILAINNE Cherifa*

Le :08 /010/2017 à 14 :00 h

Devant le jury composé de :

Mm BENAZOUZE Fella	MCB	USDB	Présidente
Mr ADEL Djalal	MAA	ISV/UnivBLIDA1	Examineur
Mr BELALA Rédha	MCB	ISV/UnivBLIDA1	Promoteur
Mr BESSAAD M <sup>ed</sup> amine	MCB	USDB	Co-Promoteur

Année Universitaire : 2016-2017



## **Remerciements**

*Au Terme de ce travail Nous remercions d'abord Dieu le tout puissant qui nous a donné volonté, patience santé et sur tout persévérance durant nos années d'études.*

*En termes de reconnaissance nous tenons à remercier tous ceux qui ont contribué à la réalisation de ce modeste travail, en particulier :*

- ❖ *Notre promoteur , **Mr BELALA Rédha**, pour ses orientations, ses conseils, d'avoir accepté de nous guider dans ce travail.*
- ❖ *Notre co-promoteur **Mr BESSAAD Med Amine**, qui a bien voulu par son aimable bienveillance diriger ce travail. , pour ses orientations, ses conseils, sa confiance et sa disponibilité, Nos chaleureux remerciements pour vous.*
- ❖ *Nous te non s'adresser nos vifs remerciements à **Mme BENAZOUZ Fella** et d'avoir accepté de présider le jury de notre soutenance.*
- ❖ *Nous remercions, **Mr ADEL DJallel** pour l'honneur d'examiner ce travail.*

*Nous exprimons toute notre sympathie à l'ensemble des membres du Laboratoire de reproduction, mais nous adressons une pensée particulière à la doctorante **Mme Aouane najma**, et Un grand merci à la doctorante **Mme sellali sabrina**.*

*Nos vifs remerciements s'adressent aux enseignants du département de BPO qui nous ont suivie tous le long de notre cursus, et qui nous ont permis d'acquérir les connaissances théoriques nécessaires pour l'élaboration de ce modeste travail.*

*En fin, nous adressons nos remerciements à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.*



*Nous remercions particulièrement le **Directeur du Laboratoire des Biotechnologies liées à la Reproduction Animale (L.B.R.A)** de l'université de **Blida1** pour nous avoir donné l'accès aux équipements de recherche et matériels de laboratoire nécessaires à la réalisation de ce travail.*

*Nous remercions également le **Directeur du Centre National d'Insémination Artificielle et d'Amélioration Génétique (C.N.I.A.A.G)** de **Baba Ali** d'avoir mis à notre disposition à titre gracieux dans le cadre d'une convention de collaboration entre le C.N.I.A.A.G et le L.B.R.A les produits chimiques, les réactifs et les colorants nécessaires à la réalisation d'une partie de ce travail. Que le C.N.I.A.A.G trouve ici l'expression de nos forts remerciements et notre sincère reconnaissance.*



# Dédicace

*Je dédie ce modeste travail à celle qui m'a donnée la vie, le symbole de tendresse, qui s'est sacrifiée pour mon bonheur et ma réussite ,à ma mère.  
A mon père, école de mon enfance, qui a été mon ombre durant toutes les années des études, et qui a veillé tout au long de ma vie à m'encourager, à me donner l'aide et à me protéger. <<Que Dieu les gardes et les protège>>*

*A mes très chers frères .*

*A mes très chères sœurs.*

*Sans oublier mes nièces .*

- *A mon Fiancée et tout la famille hayanne .*
- *A mes amis : Fatima, Khadija, kalisa, Ilham, Nabil, Moustapha, Assia, wahiba.*
- *A tous les étudiants de Master II en reproduction animale de la promotion 2016/2017.*

*A tous ceux que j'aime et ceux qui m'aime*

# CHERIFA

**Table des matières**

<b>Introduction .....</b>	<b>1</b>
---------------------------	----------

**Chapitre I : synthèses bibliographiques**

<b>1. anatomie de l'appareil génitale male chez le chien.....</b>	<b>3</b>
1.1. Les testicules.....	3
1.1. 1. Rôles des testicules.....	3
1.2.2. Le pénis.....	4
1.3. L'urètre.....	4
1.4. Les glandes annexes.....	4
1.4.1. La prostate.....	4
1.4.2. Les glandes préputiales.....	4
<b>2. la semence canine.....</b>	<b>4</b>
2.1.Caractéristiques générales de la semence canine.....	4
2.2. Composition de la semence canine.....	5
2.2.1. Le spermatozoïde.....	5
2.2.3 . Le liquide séminal.....	5
<b>3. Evaluation de la semence canine .....</b>	<b>5</b>
3.1.Les examens de routine.....	5
3. 1.1 . Spermogramme.....	6
3. 1.2. Spermocytogramme.....	9
<b>4. Détermination la concentration de la semence.....</b>	<b>9</b>
4.1. Utilisation de la cellule hématimétrique.....	10
4.2.Utilisation du spectrophotomètre.....	11
4.3.Utilisation du compteur de particules.....	12
4.4. la cytométrie de flux.....	13
4.5.La fluorescence.....	14
<b>5 . Lanalyse informatique de la semence (CASA :computerzed Assisted Sperm Analysis)...</b>	<b>14</b>

**chapitre II : Matériel et methodes**

1.Matériel.....	15
-----------------	----

1.1. Matériel biologique.....	15
1.2. Matériel non biologique.....	15
<b>2. méthodes.....</b>	<b>15</b>
2.1. Récolte de semence.....	16
2.2.Evaluation initiale de l'éjaculat.....	16
<b>3. Evaluation de la numération des spermatozoïdes dans l'éjaculat.....</b>	<b>17</b>
3.1. Préparation de la solution de dilution.....	17
3.1. Préparation la solution de dilution et immobilisation de la semence.....	18
<b>4 . Evaluation la concentration par cellule hématimétrique ( Neubauer).....</b>	<b>21</b>
<b>5. Analyse informatique de la semence.....</b>	<b>21</b>
5.1. concentration .....	22
5. 2. mobilité.....	22
6. Analyse statistique.....	23

**Chapitre III : résultats et discussion**

Resultats .....	24.
Discussion.....	32.
CONCLUSION.....	35
REFERENCES.....	36
ANNEXES.....	39

## Liste des figures

<b>Figure n°1</b> : Coupe longitudinale d'un testicule.....	3
<b>Figure n°2</b> : Coupe transversale de la paroi d'un tube séminifère.....	3
<b>Figure n°3</b> : Représentation schématique dun spermatozoïde.....	6
<b>Figure n°4</b> : Principe de la numération des spermatozoïdes.....	8
<b>Figure n°5</b> : les différents paramètres qui évaluent la mobilité spermatique.....	12
<b>Figure n° 6</b> : chaîne de récolte .....	14
<b>Figure n°7</b> : matériel de récolte (gel, les cone).....	15
<b>Figure n°8</b> : les étapes de récolte de sperme chez le chien.....	15
<b>Figure n°9</b> : Les trois différentes fractions spermatiques recueillies chez le chien (pré-spermatique, spermatique, epididymaire).....	16
<b>Figure n°10</b> : Evaluation de la mobilité par la microscope .....	17
<b>Figure n°11</b> : agitation et filtration NaCl 3%.....	17
<b>Figure n°12</b> : Matériel nécessaire au comptage des spermatozoïdes.....	18
<b>Figure n° 13</b> : comptage des spermatozoïdes par microscope optique.....	19
<b>Figure n° 14</b> : Graphique des valeurs moyennes de la concentration des spermatozoïdes par le système de CASA pour les 5 chiens (diluer : Na Cl 3% ).....	23
<b>Figure n°15</b> : Graphique des valeurs moyennes de la concentration et la mobilité des spermatozoïdes par le CASA pour les 5 chiens (diluer : liquide prostatique).....	24
<b>Figure n° 16</b> : Graphique des valeurs moyennes de la concentration des spermatozoïdes par la cellule de numération pour les 5 chiens (diluer : Na Cl 3% ).....	25
<b>Figure n°17</b> : Graphique des valeurs moyennes de la concentration des spermatozoïdes par la cellule de numération et le système de CASA pour les 5 chiens (diluer : Na Cl 3% ).....	26
<b>Figure 21</b> : la concentration des spermatozoïdes chez l'espèce canine .....	27

## **Liste des abreviation**

**SCA** : sperm class analyzer

**CASA** : Computer Aided Sperm Analysis

**OMS** : Organisation Mondiale de Santé

**NaCl** :Chlorure de Sodium

**SPZ** : Spermatozoide

**V** : Volume

**CV**: Curvilinear Velocity

**VSL** : Velocity Straight Line

**VAP** : Velocity Averagepathway

**ALH** : Amlitude of laterale Head displacement

**BCF** : beat cross frequency

Liste des tableaux

<b>Tableau I</b> : Description des trois phases de l'éjaculat du chien.....	5
<b>Tableau II</b> : Echelle d'appréciation de la mobilité de masse de la semence canine.....	7
<b>Tableau III</b> : identification chaque animale le nom, la race, la fertilité, et le numéro d'expérience.....	14
<b>Tableau IV</b> : Données sur la semence utilisé pour chaque chien.....	23
<b>Tableau VI</b> : Moyennes de la concentration pour la semence canine mesurées par analyse informatique.....	25
<b>Tableaux VII</b> : Moyennes de la concentration pour la semence canine mesurées par analyse informatique.....	26
<b>Tableau VIII</b> : Moyennes de la concentration pour la semence canine mesurées par analyse informatique.....	27
<b>Tableau IX</b> : Moyennes de la concentration pour la semence canine mesurées par analyse informatique.....	28

## Résumé :

Le présent travail vise deux objectifs à savoir:

- comparaison entre la numération des spermatozoïdes canins par une méthode classique (Cellule Neubauer ) et la mesure de la concentration par l'analyseur SCA® et la lame Leja® (20µm) en variant le dilueur de la semence avant analyse (solution saline hypertonique versus liquide prostatique).
- Comparaison de l'analyse de la mobilité des spermatozoïdes canins par le système SCA® entre la chambre d'analyse Leja® (20µm) et une chambre de même profondeur confectionnée à partir d'une simple lame porte-objet et une lamelle couvre-objet.

Pour cela, 8 éjaculats ont été récoltés à partir de 5 chiens adultes et en bonne santé puis soumis à une évaluation initiale de la qualité (mobilité massale, mobilité individuelle, vitalité). Chaque éjaculat a été réparti en cinq aliquotes pour subir chacun une analyse.

Pour l'étude de le premier objectif (Etude de concentration), trois analyses ont été effectuées comparativement à savoir une numération classique des spermatozoïdes à l'aide d'une cellule Neubauer, une mesure de la concentration au système SCA® et lame Leja® après dilution au liquide prostatique ou à une solution saline hypertonique (NaCl 3%).

Pour le second objectif (Etude de la mobilité), deux analyses ont été effectuées à savoir une analyse des paramètres de mobilité des spermatozoïdes canin par le système SCA® au moyen d'une lame Leja® (20µm) ou d'une chambre de même profondeur confectionnée à partir d'une simple lame porte-objet et une lamelle couvre-objet.

Nos résultats suggèrent que pour la concentration, le système SCA® utilisé avec une lame Leja® (20µm) ne semble pouvoir se substituer à la numération classique (Cellule Neubauer) qu'après immobilisation des spermatozoïdes (dilution à une solution saline 3%).

Pour l'analyse des paramètres de mobilité, par le système SCA®, la chambre confectionnée avec une lame-lamelle (système couvre-objet) ne semble pas pouvoir se substituer à la chambre d'analyse Leja® (20µm) et modifie aléatoirement les paramètres cinétiques analysés.

**Les mot-clés :** Semence canine – Système SCA® –Lame Leja® - Cellule Neubauer – Concentration – Paramètres de Mobilité.

## **Abstract :**

The present study aimed to:

- Compare between a classic method of canine spermatozoa counting (Neubauer counter) and the measure of concentration by mean of the image analyzer (SCA® and Leja® chamber 20µm) in 2 conditions (dilution in hypertonic solution versus prostatic fluid).
- Compare the cinematic parameters analysis by the system SCA® between the Leja® chamber (20µm) and a system of cover-slip of a same depth.

8 ejaculates were harvested from 5 adult dogs of good health then submitted to an initial evaluation of semen quality (Massal motility, individual motility, vitality). Each ejaculate was divided into 5 aliquots and each submitted to a test.

Regarding the first objective, three analyses were performed comparatively: classic counting (Neubauer counter), concentration measure by the system SCA® after semen dilution in prostatic fluid or a hypertonic solution (NaCl 3%).

Concerning the second objective, 2 analyses were realized comparatively: motility analysis by mean of the system SCA® with the Leja® chamber (20µm) or a system of cover-slip of a same depth.

Our results suggested for the concentration, that the system SCA® used with the Leja® chamber (20µm) could not replace the classic method of canine spermatozoa counting (Neubauer counter) only if the spermatozoa are immobilized (Dilution in NaCl 3%).

About the motility analysis by mean of the system SCA®, the system of cover-slip could not replace the analysis chamber (Leja®, 20µm) and seem to constrain the spermatozoa movements and affect the cinematic parameters analysed.

**Key-words :** Canine semen –SCA® System – Leja® chamber - Neubauer counter– Concentration – Motility parameters.

## **INTRODUCTION**

La biologie de la reproduction des carnivores est devenue une discipline de plus en plus importante en reproduction animal, s'articulant autour de plusieurs axes, notamment l'assistance à la fécondation. Cet axe nécessite, chez le mâle, une étude préalable et indispensable de la semence afin d'en prédire ses qualités fécondantes.

La numération des spermatozoïdes (Mesure de la concentration) est un paramètre fondamental dans l'évaluation de la semence dont dépendra tous les autres paramètres d'analyse. En effet, la mobilité, la vitalité et les anomalies morphologiques sont exprimés en pourcentages et ne pourront être convertis en nombre de spermatozoïdes qu'après avoir réalisé la numération des spermatozoïdes.

Les techniques classiques de la numération des spermatozoïdes sont basées sur l'utilisation de diverses cellules hématimétriques et le comptage manuel sous microscope des spermatozoïdes. Il existe plusieurs cellules de comptage utilisables pour la numération telles que la cellule de Malassez, la cellule de Thomas, la chambre Makler etc....

L'OMS (2010) a recommandé la cellule Neubauer (Improved Neubauer à double chambre) avec une technique très exigeante en matière de temps. Ainsi, nous avons estimé dans notre laboratoire cette durée à 45 min. Ceci représente une contrainte majeure dans les laboratoires d'analyse traitant un nombre important d'échantillons de sperme qui doivent être analysés dans les 30 min depuis leur récolte, selon les dernières recommandations de l'OMS. Cette contrainte de temps existe aussi dans les laboratoires de recherche qui doivent analyser simultanément plusieurs échantillons dans les protocoles de recherche.

Devant cette problématique, le remplacement de cette technique classique par une technique rapide s'impose. Dans ce cadre, l'analyseur de sperme assisté par ordinateur (CASA) pourrait représenter une bonne alternative, car il est capable d'effectuer cette analyse (mesure de la concentration) en quelques secondes.

L'analyseur de sperme (SCA® :Sperm Class Analyser, Microoptics Spain) déjà validé pour l'analyse de la mobilité en semence canine (Dorado et al 2011), n'a pas encore été validé pour la mesure de la concentration dans cette espèce.

Ainsi, le premier objectif du présent travail est d'effectuer une comparaison entre la numération des spermatozoïdes canins par une méthode classique (Cellule Neubauer) et la

mesure de la concentration par l'analyseur SCA® en utilisant la chambre d'analyse (Leja®) de 20µm de profondeur et en variant le dilueur de la semence avant analyse (solution saline hypertonique versus liquide prostatique). Cette dernière condition vise à évaluer l'effet du mouvement des spermatozoïdes sur la mesure de la concentration par le système SCA®.

Par ailleurs, la cellule d'analyse (Leja®) à usage unique et à quatre chambres, utilisée pour l'analyse des paramètres de mobilité avec le système SCA® demeure très onéreuse dans le marché (18.000 DA par boîte de 20 lames). Ceci représente une forte contrainte de coût dans les protocoles de recherche amenant les chercheurs à remplacer cette lame Leja® par une lame porte objet ordinaire recouverte d'une lamelle couvre-objet. Cependant nous ignorons si le recours à cette solution influence les paramètres cinétiques dans l'analyse de mobilité par le système de CASA.

Ainsi, le deuxième objectif de notre travail est de faire une comparaison entre la chambre d'analyse Leja® de 20µm de profondeur et une chambre de même profondeur confectionnée à partir d'une simple lame porte-objet et une lamelle couvre-objet.

## **Anatomie et rôles des différentes parties du tractus génital mâle du chien :**

### **1. l'anatomie de l'appareil génital mâle du chien.**

#### **1.1. Les testicules**

**Les testicules** sont des organes pairs de forme globuleuse, presque sphérique. Ils sont situés en région périnéale basse, Leur taille est proportionnelle au poids du chien **(1, 2)**.

Chaque testicule est divisé en lobules spermatiques par des cloisons émanant de l'albuginée (voir figure 1).

Chacun de ces lobules est composé des tubes séminifères, pelotonnés sur eux mêmes, et de tissu interstitiel.

La paroi des tubes séminifères est constituée des cellules de Sertoli et des cellules germinales en différenciation, Les cellules de Sertoli assurent la protection et la nutrition des cellules germinales ainsi que la production de fluide tubulaire et d'oestrogènes.

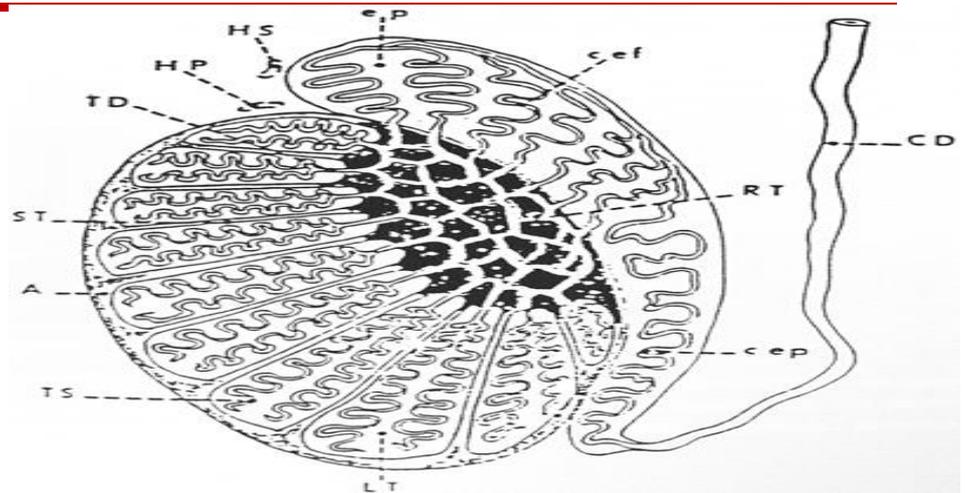
Parallèlement, les cellules germinales subissent la spermatogenèse : différenciation des spermatogonies en spermatozoïdes, dont la durée moyenne est de 62 jours. A la fin de cette différenciation, les spermatozoïdes, immobiles, sont libérés dans la lumière des tubes séminifères et sont acheminés vers le rete testis par des contractions péristaltiques.

Le tissu interstitiel des testicules correspond à un tissu conjonctif lâche qui comprend des éléments vasculaires, lymphatiques et nerveux.

Il contient également les cellules de Leydig qui assurent la synthèse des hormones sexuelles mâles, principalement la testostérone.

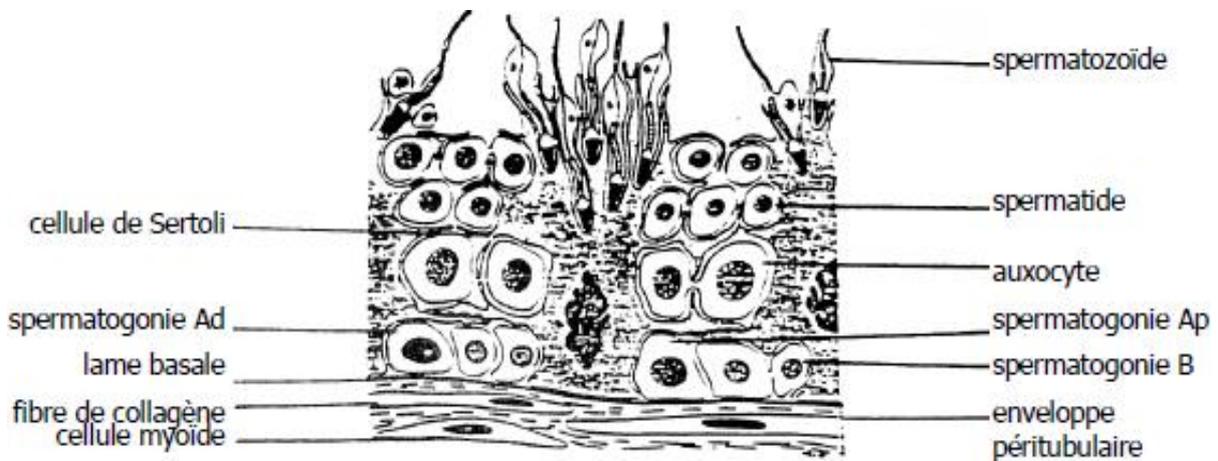
#### **Les testicules possèdent donc deux fonctions essentielles :**

- une fonction exocrine : l'élaboration des gamètes mâles ou spermatozoïdes.
- une fonction endocrine : la production d'hormones sexuelles responsables du développement et du maintien des caractères sexuels mâles **(15)**.



- |                         |                       |                          |
|-------------------------|-----------------------|--------------------------|
| A : Albuginée           | HS : Hydatide sessile | cep : Canal épидидymaire |
| ST : Septum testis      | ep : Epididyme        | TS : Tube séminifère     |
| HP : Hydatide pédiculée | CD : Canal déférent   | LT : Lobe testiculaire   |
| cef : Cônes efférents   | RT : Rete testis      |                          |

**Figure n°1** : Schéma de l'organisation du testicule et de l'épididyme (38)



**Figure n°2** : Coupe transversale de la paroi d'un tube séminifère. (4)

## 1.2 . Le pénis.

Le pénis est situé en région sous-pubienne. Sa partie terminale est protégée par un repli cutanéomuqueux : le prépuce.

Le pénis se divise en trois parties :

- la racine, extrémité fixe, attachée à l'arcade ischiatique,
- le corps, cylindroïde, relativement court,
- le gland ou extrémité libre.

Le pénis est constitué de l'urètre pénien, de tissus érectiles (les corps caverneux et le corps spongieux du gland), de muscles (bulbo-spongieux, ischio-caverneux et rétracteur du pénis) et d'un os pénien.

Il s'agit de l'organe copulateur mâle. Suite à la stimulation des zones érogènes, les fibres parasympathiques, issues du centre médullaire sacré, provoquent la vasodilatation des artères des tissus érectiles ce qui engendre l'érection (16).

### **1.3 . L'urètre**

L'urètre est un conduit génito-urinaire qui chemine de la vessie à l'extrémité du gland du pénis (16) .

Il se divise en trois parties : une partie prostatique, une partie pelvienne et une partie pénienne, et il est constitué d'une tunique musculaire, de tissu érectile et d'une muqueuse.

L'urètre a pour rôle l'acheminement des spermatozoïdes, des sécrétions épидидymaire et prostatiques jusqu'à son ostium externe, situé à l'extrémité du gland du pénis.

### **1.4 . Les glandes annexes.**

#### **1. 4 . 1 . La prostate.**

La prostate est la glande accessoire la plus importante chez le chien, située en position rétro-péritonéale. Elle enserre l'urètre au niveau du col de la vessie. Sous contrôle des androgènes, elle sécrète le liquide prostatique qui constitue la majeure partie de l'éjaculat. Ce liquide assure la dilution, le transport, la nutrition, la protection et la maturation des Spermatozoïdes (16).

#### **1.4 . 2 . Les glandes préputiales.**

Ces glandes sébacées situées à la base du gland joueraient un rôle lubrifiant et sécrèteraient des phéromones (5).

### **2 . la semence canine**

La semence canine est un liquide contenant des gamètes mâles (les spermatozoïdes) et les sécrétions provenant des glandes sexuelles accessoires, Ces deux éléments se mélangent lors de l'éjaculation (7).

**2 . 1. Caractéristiques générales de la semence canine.**

L'éjaculat de chien est un liquide blanchâtre. Le volume de l'éjaculat dépend de la race et de l'individu ; il varie de un à quatre-vingt millilitres (8).

Il se composé de trois fractions présentant des caractéristiques différentes tant au niveau de leur origine que de leur composition et de leur volume (tableau n°1).

**Tableau I : Description des trois phases de l'éjaculat du chien (9).**

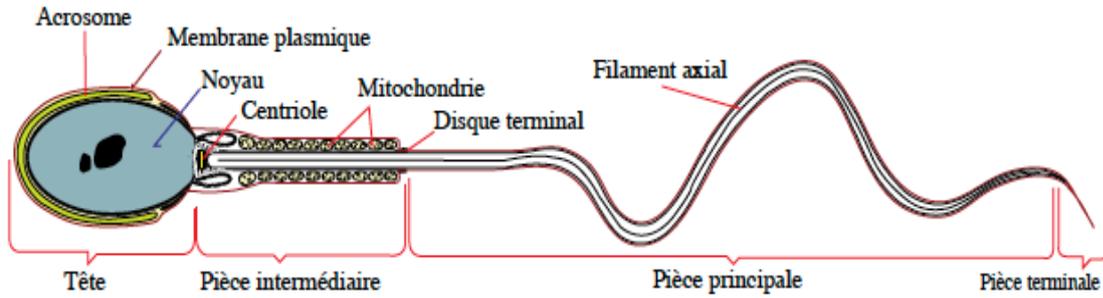
	<b>origine</b>	<b>aspect</b>	<b>volume</b>	<b>PH</b>	<b>Compostion</b>
<b>La phase pre spermetique</b>	Prostatique	Blanchâtre	0.2 à 2 ml	6.2 -6.5	+ Moins de 3 millions de spermatozoïdes + Liquide prostatique
<b>la phase spermetique</b>	Epididymaire	Plus ou moins Laiteuse	0.5 à 3.5 ml	6.3 - 6.6	+ Très riche en spermatozoïdes + Sécrétion épидидymaire
<b>la phase post spermatique</b>	Prostatique	Clair	4 à 30 ml et Plus	6.5 -7.0	+ Très rare spermatozoïdes + Liquide prostatique

**2.2. Composition de la semence canine.**

**2.2.1. Le spermatozoïde**

Le spermatozoïde est le gamète mâle. C'est une cellule haploïde hautement spécialisée, de forme oblongue. Il mesure soixante-deux à soixante-six micromètres ; la queue mesure à elle seule cinquante-cinq micromètres (9).

Il présente de nombreuses différences par rapport aux cellules somatiques. Par exemple, la teneur en eau des spermatozoïdes est très inférieure à celle des cellules somatiques. Ceci est à mettre en relation avec la relative pauvreté des spermatozoïdes en cytoplasme et avec le haut degré de condensation de la chromatine (10).



**Figure n°3** : Représentation schématique d'un spermatozoïde (11).

### 2.2.2. Le liquide séminal

Le liquide séminal est composé de fluides excrétés, de cellules et de débris cellulaires provenant des glandes sexuelles accessoires. Certains éléments du liquide séminal proviennent de la filtration du plasma sanguin tandis que d'autres sont produits par les glandes sexuelles (7).

Le liquide séminal intervient à la fois dans le transport et la nutrition des spermatozoïdes. En effet, des expériences ont montré que des spermatozoïdes prélevés dans l'épididyme conservent leurs propriétés fécondantes *in vitro*. Toutefois, *in vivo*, le liquide séminal augmente le pouvoir fécondant des spermatozoïdes (7).

## 3. Evaluation de la semence canine .

Afin d'estimer la fertilité du mâle il faut évaluer la qualité de semence (6).

Il existe deux niveaux d'évaluation de la qualité spermatique à savoir l'examen de première intention et l'examen de seconde intention.

Les premiers sont des tests de routine, ne nécessitent que peu de matériel et qui sont réalisables par le vétérinaire praticien dans son exercice en clientèle. Les seconds sont des tests plus appliqués dans l'étude du sperme.

### 3.1. Les Examens de routine

Ils sont communément appelés le spermogramme et le spermocytogramme ;

#### 3.1.1. Le spermogramme

C'est l'étude du sperme au sens strict. Le volume, l'aspect, l'odeur, le pH, la mobilité des spermatozoïdes, le nombre de spermatozoïdes ainsi que leur vitalité sont analysés (9).

dans la section suivante il sera fait mention que des élément les plus importants à savoir la mobilité et la numération.

### 3.1.1.2. Examen microscopique.

#### 3.1.1.2.1.La mobilité

La mobilité des spermatozoïdes est étudiée au microscope sur platine chauffante à 37°C entre lame et lamelle ; elle doit être effectuée rapidement après le prélèvement.

La mobilité est diminuée par les températures extrêmes, les diluants acides, l'urine, le pus, le sang et le lubrifiant. Il faut noter que la mobilité est augmentée à proximité des bulles d'air et est diminuée au niveau des bords de la lamelle (14).

Il existe deux niveaux d'observation microscopique de la mobilité spermatique, à savoir **la mobilité massale** et **la mobilité individuel**.

- **L'examen de la mobilité massale** est l'observation des mouvement de réunions et de dispersion des spermatozoïdes sur une goutte de sperme mise sur une lame au grossissement 10 la notation se fait sur une grille de 0 à 5.
- **L'examen de la mobilité individuelle** est l'observation d'une goutte de sperme le but de ce test de déterminer le pourcentage de spermatozoïde mobiles ainsi que la proportion de spermatozoïde fléchant c'est à dire qui traversent le champs rapidement en ligne droite.

**Tableau II** : Echelle d'appréciation de la mobilité de masse de la semence canine, dérivée de l'échelle de MILOVANOV (31).

Note	Interprétation
0	pas de mouvement
1	spermatozoïdes en mouvement mais pas de mouvement d'ensemble
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

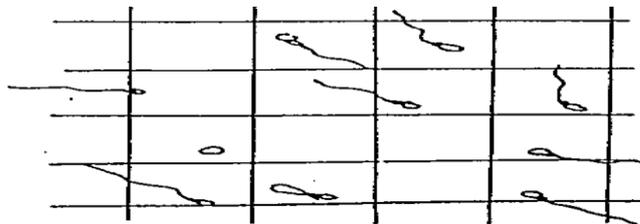
#### 3.1.1.1.4. La numération

la des spermatozoïde est réalisée à laide d'une cellule hématicométrique de Neubauer et d'un mélangeur de Potain pour cela, une partie de l'échantillon est dilué au centième

, au vingtième ou au dixième dans solution de NaCl à 3%.

En effet, la solution de NaCl 3% étant hypertonique, elle entraîne la mort des spermatozoïde et donc leur immobilité tout en préservant leur apparence, ce qui facilite la numération(30).

- une goutte est déposée entre lame et lamelle et l'observation au grossissement 40 et les spermatozoïdes sont dénombrés .
- Les spermatozoïdes sont comptés si leurs se situe tête entre les deux lignes les plus internes mais pas entre les deux lignes les plus externes
- Si un spermatozoïdes se situe sur une ligne séparant deux grands carrés adjacents,il comptés uniquement s'il se situe sur le coté supérieur ou le coté droit observé
- Compté 200 spermatozoïdes dans chaque chambres de la cellule seront comptés .
- Pour juger de la concordance des comptes dans les deux chambres,on fait la somme et la différence deux comptes on se reporte à tableaux ci-après pour voir la différence acceptable entre les deux compte en fonction de la somme des deux comptes.
- Si la différence trouvée est inférieure ou égale à la différence acceptable,les deux comptes trouvés sont valides et on utilise leur moyenne pour le calcul de la concentration se référant au tableaux (voir annexe)
- Si la différence trouvée est supérieure à la différence acceptable,les deux comptes trouvés ne sont pas valides et il faudra alors refaire la dilution .



**Figure n°4 :** Principe de la numération des spermatozoides (9)

La concentration est donnée par la formule suivante :

**Equation1 :**  $C=N /n \times 1 /20 \times \text{dilution}$

**Equation2 :**  $C =N/n \times 5 \times 10^6$

**Légende :** (N : nombre des spz/ejaculat - n: nombre de ligne compté )

### 3.1.2. Le spermocytogramme .

Il s'agit de l'appréciation de la morphologie des spermatozoïde la lecture s'effectue sur un frottis coloré. Plusieurs anomalies sont rencontrées et classées en anomalies de la tête, de la pièce intermédiaire (persistance gouttelette cytoplasmique) et du flagelle la lecture de cent spermatozoïde est effectuée au grossissement 40 pour obtenir le pourcentage de spermatozoïde normaux et anormaux dans la semence (18).

Le sperme canin est fécondant lors d'un spermocytogramme n'excédant pas 20 à 30% de danomalies (9).

#### **4 . Détermination la concentration de la semence par défferent methodes :**

**La numération** est la détermination du nombre de spermatozoïdes dans l'éjaculat. Elle peut être effectuée par des méthodes automatisées réservées aux centres spécialisés manuelles.La taille du chien doit être prise en compte lors de cet examen car le nombre de spermatozoïdes est proportionnel au poids des testicules lui-même corrélé à la taille du chien (27).

Les méthodes manuelles sont rapides, simples et ne nécessitent pas beaucoup de matériel, Le sperme est tout d'abord dilué dans un liquide hypertonique comme du chlorure de sodium à 3% qui immobilise les spermatozoïdes. Cette dilution est effectuée dans des mélangeurs de Potain utilisés habituellement pour le comptage des spermetozoides.

Elle se réalise par plusieurs techniques principales : la cellule hématimétrique, le spectrophotomètre , le compteur électronique des particules et le CASA (19) .

##### **4.1. Utilisation de la cellule hématimétrique**

Il s'agit d'un comptage direct des spermatozoïdes observés individuellement.

L'utilisation de la cellule hématimétrique ( cellule de Neubauer ou cellule de Thomas ) est assez fiable lorsque la dilution (en général au 1/100ème) est faite de façon précise à l'aide d'une micropipette de dilution pour le comptage des spermetozoides.(27,31,32,33)

##### **4.2. Utilisation du spectrophotomètre**

Cette technique est basée sur la corrélation entre la densité optique d'un échantillon de sperme dilué et sa concentration. il peuvent être plus ou moins sophistiqués et doivent être calibrés pour le sperme d'étalon. La courbe standard est généralement établie à l'aide de dilutions sériées d'un échantillon donné dont la concentration est calculée à l'aide d'une cellule hématimétrique.

L'estimation de la concentration en spermatozoïdes d'un éjaculat par mesure de la densité optique doit être considérée comme assez juste et utilisable en routine pour la préparation de doses d'insémination, mais pouvant être soumise à des biais de mesure( **19**).

#### **4.3. Utilisation du compteur de particules**

La concentration du sperme peut être déterminée à l'aide d'un appareil comptant des particules de taille connue (« Coulter counter » tels que le SpermCue®, le modèle 10 sperm counter® ou le Micro-Reader®).

Les analyseurs informatisés de la semence sont capables de donner la concentration de l'échantillon lorsque le volume utilisé est précis et l'appareil bien calibré.

#### **4.4. la cytométrie de flux**

C'est une technique d'analyse de routine des cellules ou particules biologiques en suspension qui traversent une cellule de mesure les unes après les autres. Un ou plusieurs lasers excitent chaque particule ainsi injectée. Si les particules ont été marquées avec une ou plusieurs fluorochromes, la source lumineuse excite ceux-ci et nous informe sur certains aspects biologiques supplémentaires Le cytomètre mesure la lumière de fluorescence et la lumière diffusé. Grâce à des phénomènes de diffusion lumineuse (**20**).

#### **4.5. La fluorescence**

C'est une méthode permettant d'évaluer la morphologie et le fonctionnement des cellules quelque soit la nature du milieu extracellulaire. Les caractéristiques pouvant être évaluées grâce à cette méthode sont nombreuses : la proportion de spermatozoïdes vivants et morts, le fonctionnement des mitochondries, l'intégrité de l'acrosome, la capacitation, la concentration intracellulaire en calcium, la structure de la chromatine ou les composants de l'ADN(**14**).

#### **5. Lanalyse informatique de la semence (CASA :computer Assisted Sperm Analysis) :**

L'analyseur informatique de la semence ou communément appelé le système CASA est une méthode microphotographique. il consiste en un dispositif incluant un matériel d'enregistrement microphotographique et en un support informatique pour la reconstruction et l'analyse des trajet. cette technique permet de générer un nombre considérable de parametre obtenu grace a lanalyse individuelle de chaque spermetozoide (**21**).

cette technique permet donc de réaliser des analyses objectives et précises sur la proportion de spermatozoïdes mobiles et leur mouvement (22).

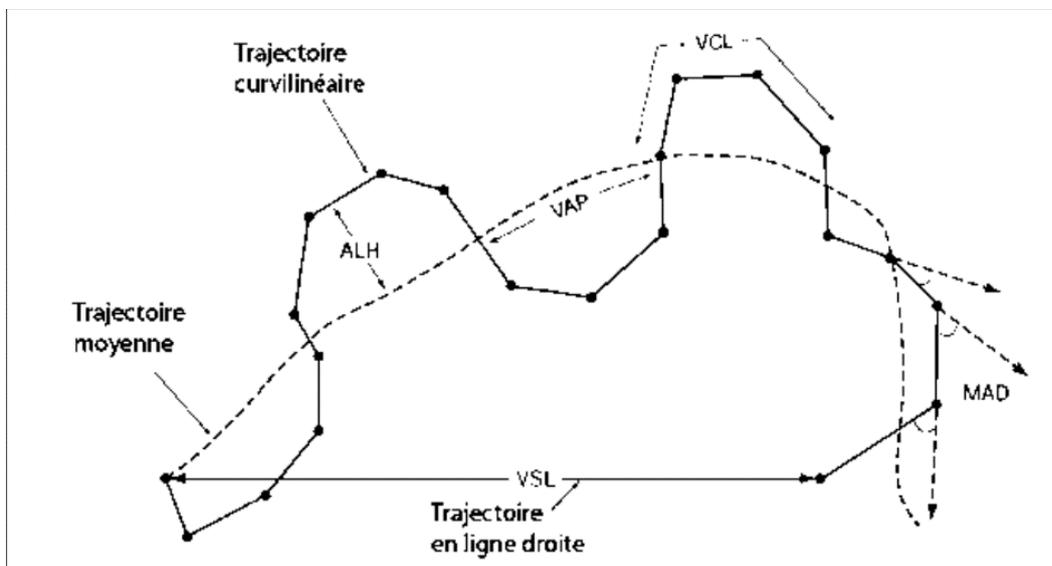
**Il calculer plusieurs paramètres de mobilité à savoir :**

- La motilité totale TMOT :ce parametre représente le pourcentage des gamètes qui bougent indépendamment de leur qualité de mouvement pa rapport à la population totale.
- Le pourcentage des spermatozoïdes progressifs (PMOT) :ce parametre inclut tous les spermatozoïdes ayant une VAP<50  $\mu\text{m}$ /seconde et une linéarité (VSL/VAP) supérieure à 75%.
- Le pourcentage des spermatozoïde statiques :il représente tous les spermatozoïdes qui ne bougent pas pendant l'analyse.
- Les mouvement rapides, moyens et lents des spermatozoïdes Speed, Medium et Slow).
- Les défferent vitesse de progression :
  - La VCL (velocity Curvilinear ) : cette vitesse prend en considération la totalité de la distance (point par point ) par courue par le spermatozoïde pour un temps donnees.
  - La VSL (Velocity straight line ) :cette vitesse prend en considération ,pour un temps donné, les points de départ et darrivée sur spermetoïdes, independamment de son trajet.
  - La (VAP) velocity Average pathway : cette vittesse correspond à la VCL, mais a pres lissage de son trajet.
  - LALH Amplitude of lateral Head displacement :ce paremètre correspond à la distance, en  $\mu\text{m}$  balayée par la tete des spermatozoïde durant le mouvement de battement.
  - Le BCF beat cross frequency :il mesure en Hezz la frequence de battement de la tete des spermatozoïdes en mouvement (nombre de battement par unité de temps )

Il s'agit d'une méthode d'analyse rapide qui permet d'analyser un grand nombre de spermetozoides en un bref temps. cependant, ce test necessite un appareillage couteux réservé pour les centres spécialisés (26).

Dans l'espece canine, GUnzel – Appel et al (1993) sont les première à évaluer lintéret de cet outil dans l'analyse du semence canin. selon Iguer-Ouada( 2001), quatre études seulement ont utilisé cet outil entre 1993 et 2001.

En 2001, Iguer ouada et verstegen ont validé pour la preméire le système d'analyse informatique SCA : Sperm Class Analyzer – version 3.2.0 fabriqué par Microptic SL, Barcelona, Spain pour l'analyse de la semence canine. ce système s'est avéré d'une bonne prcision dans l'analyse du sperme canin à condition d'être utilisé avec les bonne spécifications techniques recommandées dans cette étude (8).



**Figure n°5 :** les déférents paramètres qui évaluent la mobilité spermatique (OMS., 2010) (32).

VLC (CurvilinearVelocity) : reflète la distance totale que couvre la tête du spermatozoïde au cours de la période d'observation.

VSL (Straight-Line Velocity) : est déterminée par la mesure de la distance entre le point d'arrivée et le point de départ, en ligne droite.

VAP (AveragePathVelocity) : correspond à ladistance parcourue sur le trajet .moyen pendant la durée d'observation.

ALH (Amplitude of Lateral Head displacement) : correspond à l'amplitude de déplacement latéral de la tête.

BCF (beat cross frequency) : est la fréquence à laquelle la tête du spermatozoïde traverse la trajectoire moyenne, elle est mesurée en Hertz.MAD (meanangulardisplacement) :

Moyenne angulaire de déplacement (degrés). Les valeurs absolues moyennes de l'angle de braquage instantané de la tête du spermatozoïde le long de sa trajectoire curviligne.

Ce travail a été réalisé dans la salle de consultation spécialisée en Reproduction des Carnivores à la clinique vétérinaire de l'Institut des Sciences Vétérinaire de l'Université de Blida1, durant cinq mois (mois de Mars au mois de Juillet).

**Nous précisons que :**

Les produits chimiques, les réactifs et les colorants utilisés dans notre travail sont mis à notre disposition à titre gracieux par le **Centre Nationale d'Insémination Artificielle et d'Amélioration Génétique (CNIAAG) de Baba Ali**. Cette collaboration s'insère dans le cadre d'une convention entre le CNIAAG et le Laboratoire des Biotechnologies liées à la Reproduction Animale (LBRA) de l'Université de Blida1.

Les équipements de recherche et le matériel de laboratoire utilisés dans ce travail appartiennent au **Laboratoire des Biotechnologies liées à la Reproduction Animale (L.B.R.A) de l'Université de BLIDA1**.

**1. Matériel :**

**1.1. Matériel biologique:**

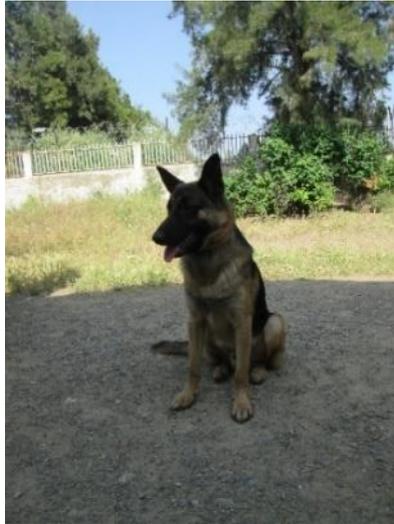
**1.1.1. Animaux :**

Cinq ( 5 ) chiens adulte en bonne santé, de sexe mâle et de fertilité confirmée ont participé à la présente étude en tant que donneurs de sperme. Après une période d'entraînement, ces chiens sont récoltés plusieurs fois avec une période d'abstinence obligatoire de deux à trois jours entre les deux récoltes.

**Tableau III** : Identification chaque animale .

Nom	Race	Age	fertilité	Expérience
Wilis	Rottweler	2ans	inconnue	3
ENZO	Berger allemand	3ans	+++	2
ROKI	Braque français	4ans	+++	1
BOB	Staff américain	2ans	++	1
BINO	Race croisée (taros+batave)	2ans	+++	1

Fertilité : ++, moyenne ; +++, excellente



**Figure n° 6 : le chien Enzo de récolte (berger allemand) ( photo personnelle)**

## **1.2. Matériel non biologique :**

Le matériel non biologique utilisé (appareillage, verreries, reactifs.....) voir annexe.

## **2.Méthodes :**

### **2.1.Récolte de sperme:**

Plusieurs éjaculats par chiens sont collectés durant cette expérimentation avec une période d'abstinence au moins 2 à 3 jours. Avant l'utilisation, nous avons réchauffer les tubes et les cônes dans une étuve.



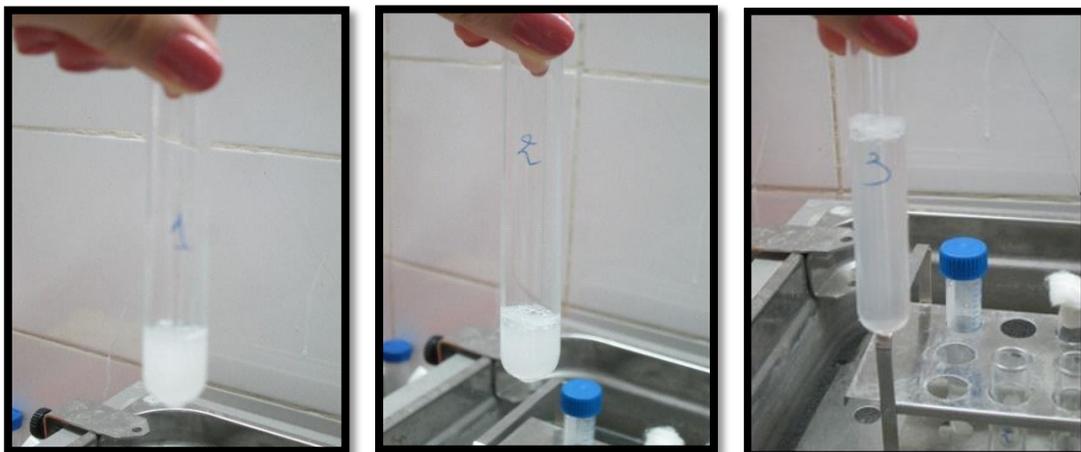
**figure n°7 : matériel de récolte (gel, les cone) (photo personnelle)**

Les éjaculats sont obtenus par une stimulation manuelle selon la technique décrite par christianson 1984 (23).



**Figure n°8** : les étape de récolte de sperme chez le chien  
(Orientation caudale du pénis) (photo personnelle )

Après la récolte, le chien est promené plusieurs minutes afin de faciliter le récalotage 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 (13).



**Figure n°9** : Les trois différentes fractions spermatisques recueillies chez le chien (pré spermatisque, spermatisque, post-spermatisque) (photo personnelle).

La fraction spermatisque riche en spermatozoïdes est conservé pour être analysée et la fraction post-spermatisque (prostatique) est mise dans les même consitions d'isothermie que la fraction spermatisque pour être utilisée comme un dilueur vital dans la mesure de la concentration.

## 2.2 . Evaluation initiale de l'éjaculat :

Les échantillons sont laissés à température ambiante pendant toute la période d'évaluation. pour le contrôle de la mobilité, seul le volume mis entre la lame et lamelle est réchauffé à 37°C sur platine chauffé .

Chaque éjaculat est soumis à une évaluation initiale comportant, le contrôle de la mobilité massale et individuelle.

Pour cela, une goutte de semence est observée directement à la recherche des mouvement de masse (mobilité massale) ou déposée entre lame et lamelle et observée par un microscope optique a une objectif de grossissement 10× à contraste de phase doté d'une platine chauffée à 37°C pour évaluer le pourcentage des spermatozoïdes mobiles fléchant (Mobilité individuelle) (20 ).



**Figure n°10 :** Evaluation de la mobilité par la microscope (photo personnelle)

## 3. La numération des spermatozoïdes:

### 3.1. Préparation de la solution Na Cl 3% :

Une solution saline à 3% a été préparée en ajoutant 3 g de NaCl à 100 ml d'un l'eau distillée à la températures ambiante. Le mélange est agité grâce à un agitateur magnétique puis filtrée en utilisant un papier de filtre. Cette solution hypertonique a été utilisée pour immobiliser les spermatozoïdes pendant la numération à la cellule Neubauer au microscope. Elle a été également utilisée pour la mesure de la concentration au SCA® avec une lame Leja ® comparativement au liquide prostatique qui conserve le mouvement des spermatozoïdes.



Figure n°11 : agitation et filtration NaCl 3%

### 3.2. Dilution par la solution hypertonique :

Nous avons dilué 5  $\mu\text{l}$  de semence avec 495  $\mu\text{l}$  d'une solution de NaCl à 3% dans un eppendorf pour obtenir une suspension diluée au 1/100<sup>ème</sup>.

### 3.3. Numération des spermatozoïdes par la cellule Neubauer:

Le sperme est tout d'abord dilué dans une solution hypertonique de chlorure de sodium à 3%, destinée à immobiliser les spermatozoïdes afin d'en faciliter le dénombrement.

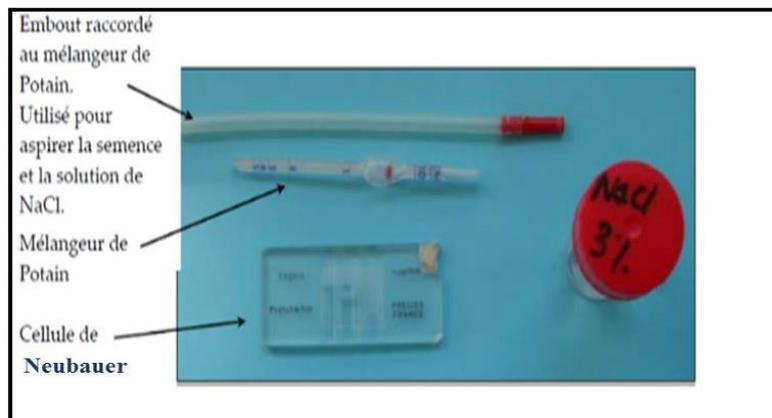


Figure n°12 : Matériel nécessaire au comptage des spermatozoïdes.

#### A - Avant de charger la cellule :

- ✓ Poser la cellule sur une surface bien horizontale, deux grilles pour la cellule de Neubauer.

- ✓ Placer la lamelle sur la cellule, en humectant les deux bords de celle-ci avec un petit chiffon humide propre et essoré,
- ✓ Faire glisser la lamelle sur la largeur de la cellule et vérifier la bonne adhésion " cellule - lamelle".

**B - Introduire le liquide à analyser dans la cellule :**

- ✓ Homogénéiser le liquide à analyser (ou sa dilution), en utilisant le vortex.
- ✓ Entre cellule et lamelle, laisser rentrer, par capillarité, une goutte de 10µl de l'échantillon à numérer, grâce à une micro pipette.
- ✓ La goutte ne doit pas déborder dans les rigoles de la cellule et la goutte doit recouvrir complètement et d'un seul coup toute la surface quadrillée de la cellule.
- ✓ Attendre au moins 5 - 10 minutes, la cellule bien à l'horizontal .

**C - Avant de faire le comptage :**

- ✓ Faire une observation à l'objectif x10 non seulement pour repérer le quadrillage mais aussi pour vérifier que les cellules à compter sont réparties de façon homogène .
- ✓ Si l'homogénéité est jugée insuffisante il faut tout recommencer, c'est-à-dire charger un nouvel hématimètre à partir de la suspension réhomogénéisée.
- ✓ Passer à l'objectif x40 pour effectuer le comptage Pour les éléments chevauchent les lignes, comptez tous ceux qui chevauchent les lignes.
- ✓ Compter 200 spermatozoïdes sur la première chambre.
- ✓ Compter le même nombre des lignes sur la deuxième chambre.
- ✓ Calculer la somme.
- ✓ Déterminer l'acceptabilité de la différence entre les décomptes (Tableau voir annexe).
- ✓ Si la différence est acceptable calculez la concentration si non recommencez le comptage depuis le début.
- ✓ Nous avons ensuite extrapolé ce nombre à l'éjaculat selon la formule suivante :

-Le volume de chaque ligne 20 nl.

**Equation1 :  $C = N / n \times 1 / 20 \times d$**

**Equation2 :  $C = N / n \times 5 \times 10^6$  SPZ/ml**

**N:**nombre spz/éjaculat - **n:**le nombre de ligne compté - **d :**dilution)



**Figure n°13:** Comptage des spermatozoïdes par la cellule Neubauer. (Photo personnelle )

#### 4. Analyse informatique de la semence par le système SCA®.

##### 4.2. Mesure de la concentration :

Le mesure de la concentration des spermatozoïdes par le système SCA® a été effectué à deux niveaux différents à savoir: semence diluée au NaCl 3% versus semence diluée au liquide prostatique.

	Sperme dilué	la dilution
CASA	45µl Na Cl 3% +5µl sperme pure	(1 :99 ) 1/100
	90µl liquide prostatique+10 sperme pure	(1 :99 ) 1/100

Pour chaque analyse, un volume de 5µl de semence diluée est placé sur une cellule Leja® préchauffée à (37°C) puis laissé se stabiliser pendant 1 min sur la platine chauffée avant analyse (21).

##### 4.2. Analyse de la mobilité:

###### 4.2.1. Analyse de la mobilité au moyen d'un couvre-objet (Lame et lamelle) :

Pour remplacer la lame Léjà®, nous déposons une goutte de sperme d'un volume de 10 microlitres sur une lame de verre qui sera recouverte avec une lamelle de verre de 22x 22 mm. La profondeur (Depth, µm) d'une chambre d'analyse est égale au rapport du volume de semence ( $V, \mu\text{m}^3$ ) sur l'aire de la chambre d'analyse ( $A, \mu\text{m}^2$ ) qui est le produit de la

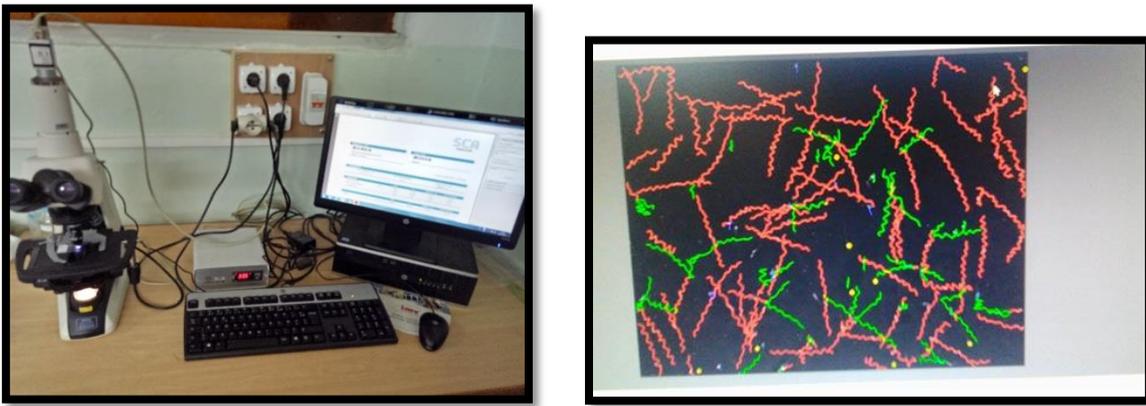
longueur ( $L$ ,  $\mu\text{m}$ ) et la largeur ( $l$ ,  $\mu\text{m}$ ) de la lamelle. [  $D$  ( $\mu\text{m}$ ) =  $V$  ( $\mu\text{m}^3$ ) /  $A$  ( $\mu\text{m}^2$ ).  $A$  ( $\mu\text{m}^2$ ) =  $L$  ( $\mu\text{m}$ ) \*  $l$  ( $\mu\text{m}$ ) ].

Dans les conditions de notre expérimentation, la profondeur de chambre obtenue entre lame et lamelle est d'environ  $20\mu\text{m}$  ( $20.66\mu\text{m}$ ) ce qui s'approche de la chambre d'analyse Léja® utilisée comparativement.

Deux chambres ont été confectionnées sur la même lame porte objet pour ainsi dupliquer l'analyse de la mobilité.

#### 4.2.2. Analyse de la mobilité au moyen d'une lame Leja® 20 $\mu\text{m}$ :

Un volume de  $5\mu\text{l}$  de semence pure est placé sur une lame de lija de volume  $3\mu\text{l}$  préchauffée à ( $37^\circ\text{C}$ ) puis laissé se stabiliser pendant 1 min sur la platine chauffée avant analyse.



**Figure n°14 :** analyse informatique de la semence canine par l'analyseur SCA MICROPTCS.

Pour analyseur informatique de la semence, nous avons utilisé l'analyseur Sperm Class Analyzer (SCA®) Evolution, v. 6.2 de MICROPTCS, Spain. Ce système a déjà été validé pour analyse des paramètres de mobilité du sperme canin (23).

Ce système intègre un microscope trinoculaire à contraste de phase négative (eclipse E200, NiKon, Tokyo, Japan), une platine chauffée microscopique, une camera à haute résolution (A321fc, BaslerTMAG, Ahrensburg, Germany) et un ordinateur de marque ACER (Intel inside r, pentiumr 4) pour sauvegarder et analyser les données après acquisition.

## 5. Analyse statistique.

Les résultats bruts sont générés sur un fichier MicroSoft Excel par le système SCA®. Ils sont par la suite analysés par le logiciel XLSTAT 2014 (version d'évaluation) pour appliquer une analyse de la variance (ANOVA) suivie d'un test de TUKEY. Le but de cette analyse est d'étudier d'une part les différences entre les valeurs de concentrations obtenues par Cellule Neubauer versus système SCA® et d'autre entre les valeurs de mobilité obtenues au système SCA® par la lame Leja ® versus la lame-lamelle (couvre-objet).

Les résultats sont présentés sous forme des moyennes plus ou moins erreur standard de moyenne (Mean+ SEM). La différence est considérée significative si  $p < 0.05$ .

**1. Résultats de l'évaluation initiale de la semence.**

Nous présentons dans le tableau suivant les caractéristiques des différents éjaculats récoltés et inclus dans cette étude recueillis lors de l'évaluation initial à savoir le volume (mL), la mobilité massale, la mobilité individuelle, la vitalité ainsi que la concentration des spermatozoïdes.

**Tableau IV:** Caractéristique des éjaculats utilisés pour l'expérience

<b>Chiens</b>	<b>Volume (ml)</b>	<b>Mobilité individuelle</b>	<b>Mobilité massale</b>	<b>Vitalité</b>	<b>Concentration (Spz/ml) 10<sup>6</sup></b>
<b>WILIS 1</b>	1	4/5	80%	76%	425
<b>ENZO 1</b>	2	4/5	70%	83%	642,5
<b>WILIS 2</b>	2	3/5	70%	70%	727
<b>ENZO 2</b>	2	4/5	50%	65%	103,5
<b>WILIS 3</b>	1,89	4/5	70%	76%	888,5
<b>ROKI</b>	1	4/5	80%	90%	597,5
<b>BOB</b>	0,98	5/5	80%	77%	980
<b>BINO</b>	2,2	5/5	75%	88%	888

2. Résultats de la numération et la mesure de la concentration.

2.1. Etude comparative de la concentration des spermatozoïdes par la cellule de numération (neubauer) et le system SCA® (NaCl 3%).

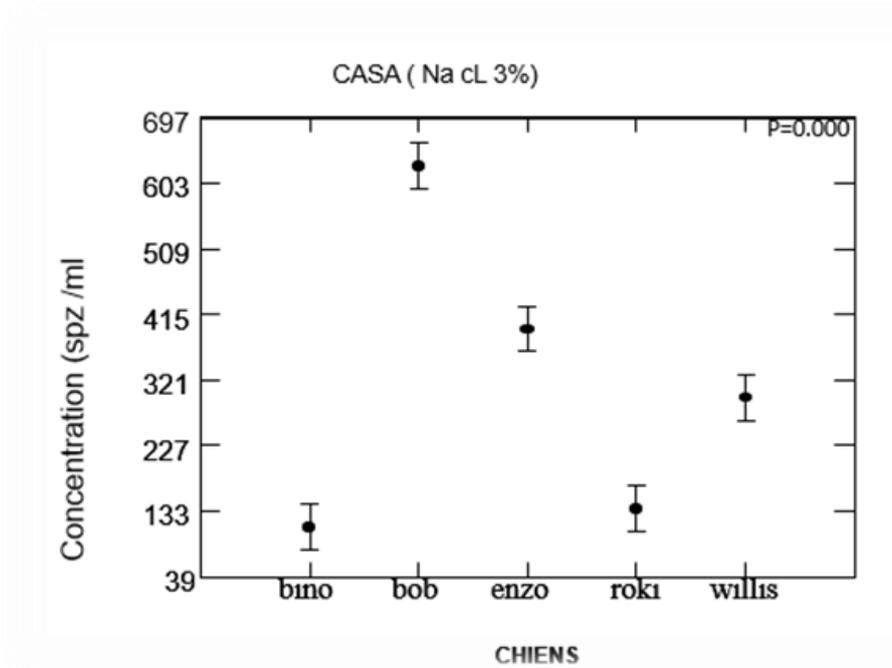


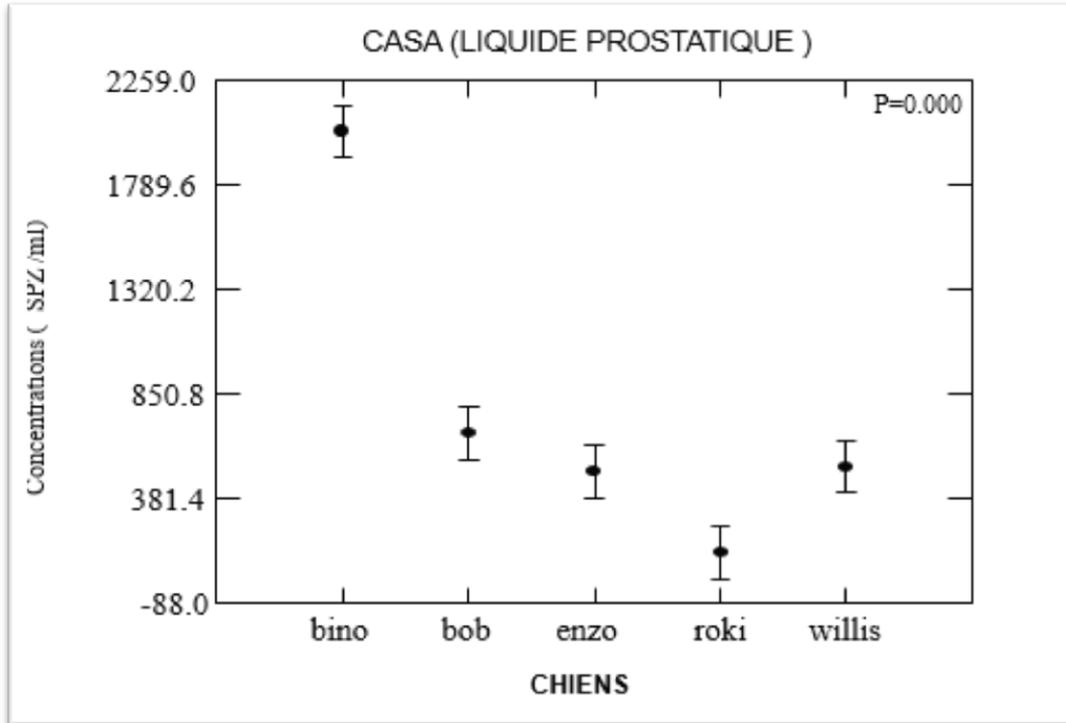
Figure n° 15 : Graphique des valeurs moyennes de la concentration des spermatozoïdes par le system de SCA® pour les 5 chiens (diluer : Na Cl 3% ).

D'après les resultats obtenus, nous remarquons que le chien Bob représente la concentration la plus élevée environ (603spz /ml) suivi le chien Enzo (415ml/spz) puis le chien Willis (321 ml/spz) et roki (133ml/spz) .la concentration la plus faible est obtenu par chien Bino environ (100 ml/spz).

Tableau VI : moyennes de la concentration pour la semence canine fraîche mesurée par analyse informatique .

Analyse la variance					
source	Sum of squers	df	mf-ratoin	f-ratoin	p
chiens	533793,333	4	133448,333	41,170	<b>0,000</b>

**2.2. Etude comparative de la concentration des spermatozoïdes par la cellule de numération (neubauer) et le system SCA® (Liquide prostatique).**



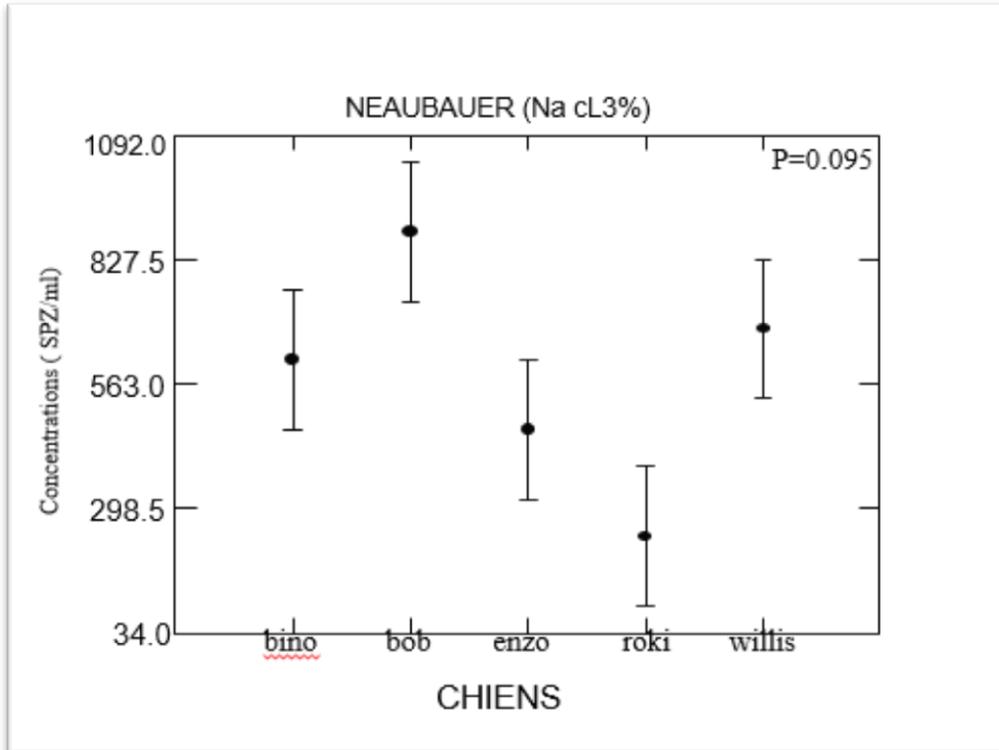
**Figure n°16 :** Graphique des valeurs moyennes de la concentration et la mobilité des spermatozoïdes par le SCA® pour les 5 chiens (diluer : liquide prostatique).

D'après les résultats obtenus, nous remarquons que le chien bob représente la concentration la plus élevée environ (2200 spz /ml) suivi le chien Enzo environ (700 ml/spz) puis le chien willis (500 ml/spz) et Roki (150 ml/spz) .la concentration la plus faible est obtenu par chien roki environ (100 ml/spz).

**Tableaux VII :** moyennes de la concentration pour la semence canine frais mesurées par analyse informatique .

Analyse la variance					
source	Sum -of- squares	df	Mean-squere	f-ratoïn	p
Chein	640330,267	4	1600827,567	38,863	<b>0.000</b>

**2.3. Les moyennes de concentration des spermatozoïdes par la cellule de numération (neubauer) pour les différents éjaculats.**



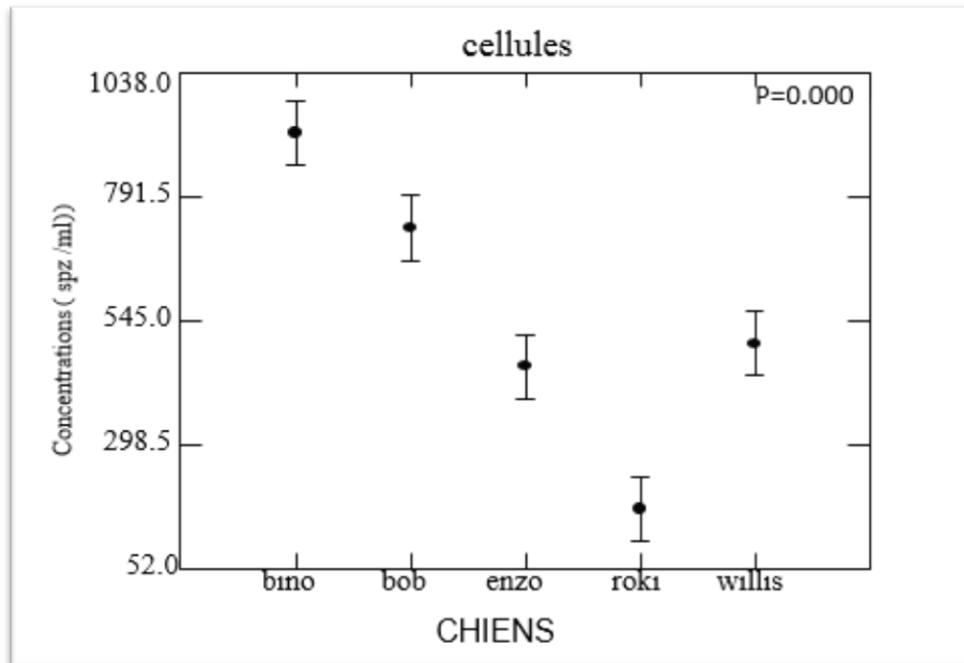
**Figure n° 17 :** Graphique des valeurs moyennes de la concentration des spermatozoïdes par la cellule de numération pour les 5 chiens (diluer : Na Cl 3% )

Les résultats de la figure (17) montrent que le chien Bob représente la concentration la plus élevée environ (900 ml/spz) suivi les deux chiens Willis et bino presque la même (570 à 600 ml/spz) puis Enzo environ (500ml/spz) .la concentration la plus faible obtenue Roki (200 spz/ml)

**Tableaux n° :** moyennes de la concentration pour la semence canine frais mesurées par analyse informatique.

Analyse la variance					
source	Sum -of- squares	df	Mean-square	f-ratoin	p
Chein\$	701357,333	4	175339,333	2,666	<b>0,095</b>

2.4. Les moyennes de la concentration par la cellule Neubauer et le system SCA®.

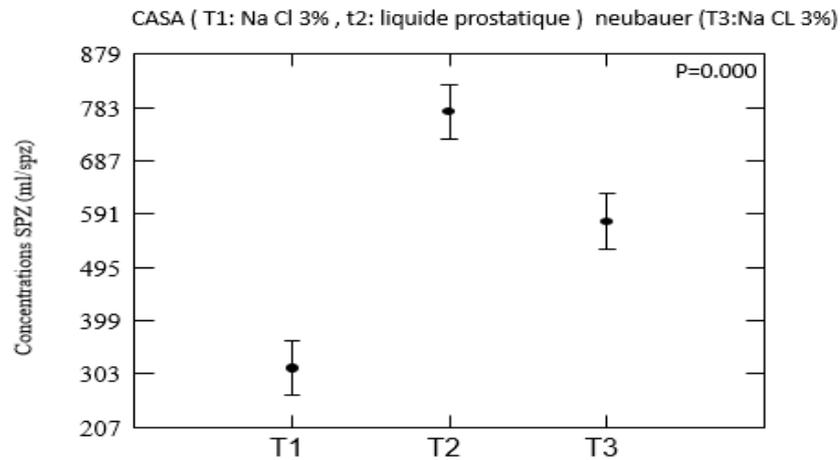


**Figure n°18** : moyennes de la concentration pour la semence canine frais mesurées par la cellule de numération et le system de SCA®.

D'après les résultats obtenus, nous remarquons que le chien bino représente la concentration le plus élevé environ (999 spz /ml) suivi le chien bob environ (600 ml/spz) puis le chien willis (500 ml/spz) et roki (200 ml/spz) .la concentration la plus faible est obtenu par chien roki environ (100 ml/spz).

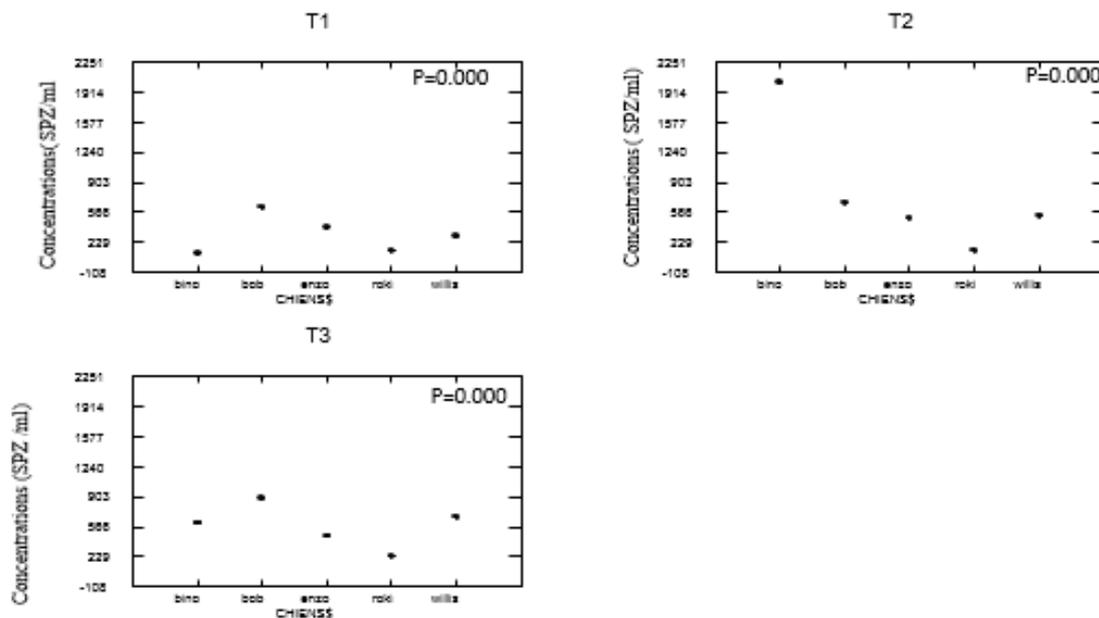
Source	Sum -of- squares	df	Mean-squere	f-ratoin	p
Cheins	2912292,311	4	1615027,600	19,821	0.000
CONC	807513,800	2	728073,078	21,984	0,000
Chiens * CONC	4726168,622	8	590771,078	16,083	0,00

**2.5. Les moyennes de la concentration par la cellule Neubauer et le system SCA® et les différents éjaculats.**



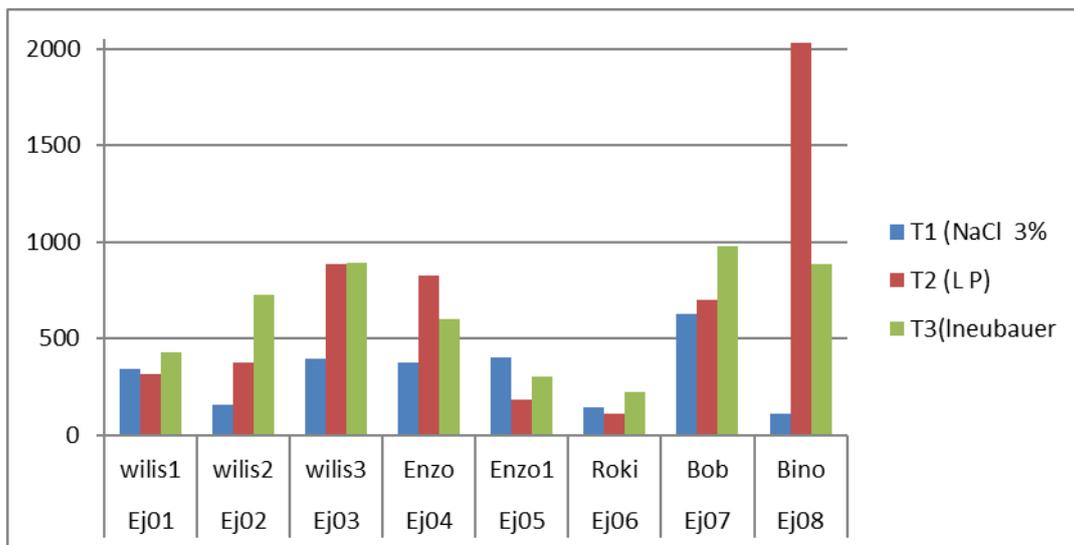
**Figure n°19 :** Graphique des valeurs moyennes de la concentration des spermatozoïdes par la cellule de numération et le system de SCA® pour les 5 chiens (diluer : Na Cl 3% )

Les résultats de la figure (19) montrent que, les chien de T2 analysé par le system SCA qui dilué par le liquide prostatique représente la concentration plus élevé (783spz/ml) suivi les chien de T3 compté manuellement par la cellule de numération (neubauer) qui dilué dans la solution Na CL 3% hypertonique, la concentration la plus faible est obtenu par les chien de T1 analysé par le system de SCA® dilué dans la solution NaCl 3% hypertonique .



**Figure n°20 :** Graphiques des valeurs moyennes de la concentration des spermatozoïdes par la cellule de numération et le SCA® pour les 5 chiens (diluer : Na Cl 3%).

Ces résultats confirment, Les résultats de la figure (20) montrent que, les chiens de T2 analysés par le système SCA® qui dilués par le liquide prostatique représentent la concentration la plus élevée suivis des chiens de T3 comptés manuellement par la cellule de numération (neubauer) qui dilués dans la solution NaCl 3% hypertonique, la concentration la plus faible est obtenue par les chiens de T1 analysés par le système de SCA® dilués dans la solution NaCl 3% hypertonique.

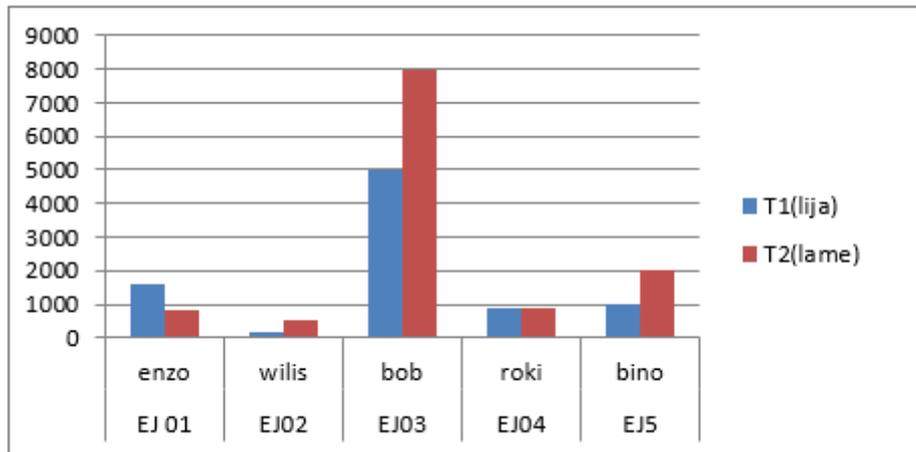


**Figure 21:** la concentration des spermatozoïdes chez l'espèce canine .

Les résultats de la figure (21) montrent que, la concentration des spermatozoïdes chez l'espèce canine varie environ de 600 à 100 (spz/ml) pour le T1 (SCA® : NaCl 3%), et de 2088 à 90 (spz/ml) pour le T2 (SCA® : liquide prostatique), et pour T3 (neubauer : NaCl 3%) varie entre 950 et 250 (spz/ml).

### 3. Résultats de l'analyse de la mobilité par le système SCA®.

#### 3.1. Etude comparative entre l'analyse de lamobilité (SCA®) par la lame Leja® et le couvre-objet (lame-lamelle).



**Figure 22 :** La mobilité des spermatozoides chez l'espèce canine .

D'après les résultats obtenus (figure 22), nous constatons que la mobilité varie entre 100 à 5000 ( $\mu\text{m/s}$ ) pour la lame de lija et 300 à 8000 ( $\mu\text{s}$ ) pour la lame couvre objet.

En effet, la mobilité la plus élevée est obtenue par la lame de couvre objet et la lame de lija qui sont issues de EJ03 (chien bob), en revanche, la plus faible de la mobilité est enregistrée au niveau de la lame de couvre objet et la lame de lija qui sont issues de EJ02 (chien willis).

---

**Discussion :**

**1. Mesure de la concentration des spermatozoïdes par le système SCA®:**

L'utilisation des systèmes SCA® aux centres d'insémination et d'analyse ne cesse pas d'augmenter surtout en termes de l'évaluation de la motilité du sperme humain ainsi que pour diverses espèces animale (Ibãnescu et al., 2016). Ce système a déjà été validé pour l'analyse de la mobilité chez l'espèce canine (Dorado et al., 2011).

Pour la mesure de la concentration, le système SCA® a été récemment validé par certains auteurs pour le spërme humain (Force et al., 2015). Cependant, à notre connaissance, aucune étude avant la présente, n'a eu pour objectif de comparer la numération des spermatozoïdes par méthode classique avec la mesure par le système SCA®.

Dans la présente étude, nous avons utilisé comme référence la technique et la cellule de numération (Neubauer) recommandées par l'OMS dans le dernier manuel des techniques d'analyse de sperme (OMS, 2010). En respectant scrupuleusement le protocole recommandé par l'OMS (2010), la durée de réalisation de cette numération a été estimée dans notre laboratoire à un temps moyen de 45 mn (unpublished data). Ceci est très contraignante en matière de temps et ne semble pas s'adapter aux conditions de travail des laboratoires d'analyse qui ne disposent que de 30mn pour entammer l'analyse d'un échantillon de sperme reçu depuis sa récolte selon toujours les recommandations de l'OMS (2010). La même contrainte de temps est valable pour les laboratoires de recherche en andrologie qui doivent tester plusieurs éjaculats simultanément. Ainsi, le recours à l'analyseur de sperme SCA® pourrait représenter une alternative intéressante à la numération classique.

Le fabricant du système SCA® (Microptics, Spain) a conçu un seul module informatique (Module MOB et CONC) pour analyser simultanément la mobilité et la concentration. Sachant que le principe de la numération de spermatozoïdes exige de les immobiliser (solution saline hypertonique ou formolée) pour pouvoir les dénombrer visuellement, nous avons tester ce système dans les conditions (dynamique et statique). Cette condition a été réalisée en diluant le sperme d'une part dans du liquide prostatique du même éjaculat capable de conserver sa mobilité et d'autre part dans une solution saline hypertonique (NaCl 3%) destinée à immobiliser les spermatozoïdes. Notre objectif est d'évaluer l'effet du mouvement des spermatozoïdes sur la mesure de la concentration au système SCA®.

Les résultats de l'analyse de variance (ANOVA) ont montré des différences significatives entre la numération classique (Neubauer) et la mesure de la concentration au système SCA® (Leja®) en diluant le sperme au liquide prostatique. Aucune différence significative n'a été enregistrée entre la numération à la cellule Neubauer et le système SCA® avec un échantillon dilué à la solution saline de 3%.

Contrairement à ce qui a été rapporté en semence humaine (Force et al., 2015), nos résultats suggèrent que dans nos conditions expérimentales, on ne peut recommander le système SCA® et la lame Leja® comme alternative pour la numération avec la cellule Neubauer.

Par contre, si on immobilise les spermatozoïdes avec une solution hypertonique (NaCl 3%) cela pourrait améliorer la précision du système SCA® dans la mesure de la concentration. Ceci implique qu'il faut séparer l'analyse de la concentration de l'analyse de mobilité, contrairement aux recommandations du fabricant du système SCA®.

Il est à noter que le faible nombre d'éjaculat et de répétitions par analyse dans notre étude pourrait représenter un biais dans notre étude. Il serait intéressant de refaire cette expérimentation sur un nombre plus important d'éjaculat en répétant chaque analyse dix (10) fois pour calculer le coefficient de variation.

## **2. Analyse des paramètres de mobilité spermatisques par le système SCA®:**

L'analyse des paramètres de mobilité par le système SCA® et la lame Leja® (20µm de profondeur) a été déjà validée en sperme canin par DORADO et ses collaborateurs en 2011. Par ailleurs, la Leja® a été trouvée meilleure que la chambre Makler® en semence humaine (Force et al., 2016).

Cependant, cette chambre d'analyse (Leja®, 20µm) demeure un consommable très onéreux (18.000 DA la boîte de 25 lames). Cette contrainte de coût amène plusieurs manipulateurs à recourir vers l'utilisation d'une simple lame porte objet (en verre) recouverte après dépôt de semence d'une lamelle couvre-objet, à l'instar de la méthode subjective d'évaluation visuelle de la mobilité individuelle, notamment que le fabricant du système SCA® prévoit dans le logiciel du système l'option couvre-objet.

A notre connaissance, l'utilisation d'une lame-lamelle n'a fait l'objet, avant le présent travail, d'aucune étude publiée. Ainsi nous nous sommes fixés pour objectif de comparer la lame

Leja® 20µm à une chambre confectionnée avec une lame-lamelle de façon à avoir la même profondeur de chambre (20µm).

En effet, il est bien établi qu'une profondeur de chambre de moins de 20µm compromet les mouvements rotationnels des spermatozoïdes (Le Lannou et al, 1993 ; Kraemer et al., 1998).

Au vu de nos résultats, les valeurs obtenues par la lame Leja® diffèrent significativement de celles obtenues par lame-lamelle (couvre-objet) et ce système ne semble pas pouvoir se substituer à la chambre d'analyse Leja® même si la profondeur théorique (calculée) est la même.

Ce constat pourrait s'expliquer par le fait que la Lame Leja® dispose d'une chambre d'une profondeur réelle de 20µm qui est un espace suffisant pour bien analyser le mouvement ondulatoire des spermatozoïdes qui évolueront dans cette épaisseur liquidienne. De plus, la semence est chargée dans cette chambre calibrée avec un volume fixe (2µL) et par effet de capillarité ce qui assure une distribution homogène de l'échantillon.

Dans le cas de la lame-lamelle, la distribution de l'échantillon se fait de façon aléatoire dépendant de la pose de la lamelle couvre-objet. Ceci pourrait compromettre les mouvements des spermatozoïdes et modifier aléatoirement d'un échantillon à un autre ainsi les paramètres cinétiques analysés par le système SCA®. Ainsi, ce système de lame-lamelle accuse une perte de précision dans l'analyse automatisée de la mobilité.

Ce même constat a été rapporté dans la comparaison entre la lame Leja® et la chambre MAKLER® par Dr FORCE et ses collaborateurs en 2016 en semence humaine.

## **Conclusion**

A l'issue du présent travail, nous concluons ce qui suit :

- ❖ Dans nos conditions expérimentales, on ne peut recommander, comme alternative à la numération classique des spermatozoïdes canin (Cellule Neubauer), le système SCA® et la lame Leja® (20µm) si la mesure de la concentration doit de faire simultanément avec l'analyse de la mobilité tel que recommandé par le fabricant du système.
- ❖ Le système SCA® utilisé avec lame Leja® (20µm) semble pouvoir se substituer à la numération classique des spermatozoïdes canins (Cellule Neubauer), si la mesure de la concentration se fait isolément de l'analyse de la mobilité après immobilisation des spermatozoïdes (dilution à une solution saline 3%).
- ❖ Dans l'analyse des paramètres de mobilité des spermatozoïdes canins par le système SCA®, la chambre confectionnée avec une lame-lamelle (système couvre-objet) ne semble pas pouvoir se substituer à la chambre d'analyse Leja® (20µm). Ce système couvre-objet pourrait compromettre les mouvements des spermatozoïdes et modifier aléatoirement les paramètres cinétiques analysés.

En perspective, il serait intéressant de refaire cette expérimentation sur un nombre plus important d'éjaculat en répétant chaque analyse dix (10) fois pour calculer le coefficient de variation (CV).

## Références bibliographique

### 1. **BARONE R. (1978)**

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

### 2. **COLLIN B. (2003)**

Anatomie du chien. Edition Derouaux Ordina, Liège, 562 pp.

### 3. **FONTBONNE A., BUFF S., GARNIER F. (2000)**

Données récentes en physiologie et endocrinologie sexuelles dans l'espèce  
canine. Le point vétérinaire, 31, 209, 27-32

### 4. **REECE W.O. (1997)**

Male reproduction. In : Reece W.O. (eds.). Physiology of domestic animals. Second edition.  
Williams and Wilkins Compagny, Baltimore, 344-365..

### 5. **JOHNSTON S.D., ROOT KUSTRITZ M.V., OLSON P.N.S.**

Sexual differentiation and normal anatomy of the dog. In : Johnston S.D. (eds.). Canine and  
feline theriogenology. W.B. Saunders compagny, Philadelphia, 275-286.

### 6. **FONTBONNE A. (1992)**

Physiologie sexuelle du chien mâle. In : Pages J.P. (eds.). Les indispensables de l'animal de  
compagnie.

Reproduction du chien et du chat. PMCAC Edition, Paris, 19-26.

### 7. **PRINS G.S. (1998)**

Semen In : Knobil E., Neill J.D. (eds.) Encyclopedia of reproduction. Volume 4. Academic  
press, San Diego, 360-367.

**8. JOHNSTON S.D., ROOT KUSTRITZ M.V., OLSON P.N.S. (2001)** Semen Collection,  
Evaluation, and Preservation. In : Johnston S.D. (eds.). Canine and feline theriogenology.  
W.B. Saunders

compagny, Philadelphia, 287- 306.

### 9. **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.

**10.MILLETTE C.F. (1998)**

Spermatozoa. In : Knobil E., Neill J.D. (eds.). Encyclopedia of reproduction. Volume 4. Academic press, San Diego, 586-596.

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

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

**12.JOHNSTON S.D., ROOT KUSTRITZ M.V., OLSON P.N.S. (2001)**

Semen Collection, Evaluation, and Preservation. In : Johnston S.D. (eds.). Canine and feline theriogenology. W.B. Saunders compagny, Philadelphia, 287- 306.

**13.KUTZLER M.A. (2005)**

Semen collection in the dog. Theriogenology, 64, 747-754.

**14 .PENA MARTINEZ A.I. (2004)**

Canine fresh and cryopreserved semen evaluation. Anim. Reprod. Sci., 82-83, 209-224.14

**14.FELDMAN E.C., NELSON R.W. (1987)**

**15.SETCHELL B. (1991) Male reproductive organs and semen. In : CUPPS P., editor.**

Reproduction in domestic animals. 4th ed. San Diego : Academic press, 221-245.

**16. VAISSAIRE JP. (1977) Sexualité et Reproduction des Mammifères Domestiques et de**

Laboratoire. Paris : Maloine, 457 p.

**17.( Blanchard TL, et al. Manual of equine reproduction. 2nd edition. Mosby 2003 Tibary A, Bakkowy M. Reproduction equine. Tome II: l'étalon. Actes 2005)**

**18.(ottR.S.,GOffaux M.,Thibier M . 1987)**

**19.( Blanchard TL, et al. Manual of equine reproduction. 2nd edition. Mosby 2003 Tibary A, Bakkowy M. Reproduction equine. Tome II: l'étalon. Actes 2005).**

**22. Blanch E,TomasC,Mocé ML, viudes de castro MP,vicente JS,mocé E,2008 :effect of CLC and two diluents on boar sperm cryosurvival.In:Gomez E (ed.),joint international Meeting of AERA-BAS,GIJon,Spain.Reprod domest Anim 43,71-72 (abstract p59)**

**23.Dorado J et al;2011**

**21.(MaoJ,WuGM,PratherRS,Smith MF,Cantley T,Rieke A,Didion BA,Day BN,2005:effect of methyl beta cyclodextrin treatment of pig spermatozoa on in vitro fertilization and embryo developpement in the absence or presence of caffeeine Theriogenology 64,1913-1927.**

**24.ALLIMANT M. (2010)**

Actualités sur les méthodes d'évaluation de la qualité de la semence de l'étalon.

Thèse de doctorat vétérinaire, Université Claude- Bernard, Lyon, 138p

**22. Théret M., Neyrenuf O.**-Prélèvement de la semence dans l'espèce canine

– Rec .Méd.vét.,1983,159,11,985-988 .

**23 .(péna Mrtinez A.I.2004)**

**24.(iguer- ouadaM ;2001)**

**25.Fontbonne A.(1991)** contribution à l'étude du sperme de chien :influence de la glycérolisation et de la dilution.Thèse Méde,vét,Alfort.

**26. Dorado J et al ;2001Verstegen J.P., Iguer-Ouada M., Onclin K., 2002.** Computer assisted semen analyzers.

**in andrology research and veterinary practice. Theriogenology .57:149–79.**

**27. (2001) Johnston et al., 2001b)**

**28.(Gerard et al., 2008)**

**29.(Auger., 1997).**

**30.Blonz O.**-Techniques d'examen du sperme du chien – Thèse Doct.vét

**31. OMS., 2010.** WHO laboratory manual for the Examination and processing of human semen. 5<sup>ème</sup> édition. WHO Press, Switzerland. Pp. 286.

## Annexe N°01

### Appareillage

- Bain marie
- Etuve
- Balance électronique pour poser les poudres
- Agitateur
- Vortex
- Microscope optique de type « Olympus BH-2 »
- SCA Le Sperm Class Analyzer® (SCA®) est un système CASA qui permet de gérer et d'analyser les échantillons de sperme humain et animal en suivant les critères de l'Organisation Mondiale de Santé (OMS).

Les composants basiques du système sont :

- ✓ Microscope a contraste de phase ;
- ✓ Caméra ;
- ✓ Un ordinateur (consulter le minimum requis) avec le logiciel d'analyses SCA®

### Verrerie et accessoires :

- Flacon
- Becher 100ml
- Entonnoir
- Baromètre
- Boite de pétri
- Fiole jaugée.
- Chiure
- Cellule de numération (cellule Neubauer)
- Micropipette 100ul, 1000ul.

#### Consommables

- Gants.
- Coton.
- Ambouts bleus et jaunes.
- Eau distillée.
- Portoirs en plastique
- Tube à essais en verre et en plastique.
- Lame de verre.
- Lamelle de verre.
- Lame de Lija .
- Eppendorf.
- Papier filtre.
- Papier fine.
- Papier absorbant.

### Quelques réactifs et produit chimique :

- Méthanol.
- Eau distillée.
- Alcool.
- La solution NaCl3%.

#### Matériel de récolte :

- Gel lubrifiant.
- Les cônes de récolte.
- Le tube gradué.
- Tube sec.
- La salle de récolte.
- Les gants

#### Préparation de la solution de Na Cl 3% :

4g Na Cl + 100 $\mu$ L eau distillé

**Tableau I :** Aptitude à la récolte des animaux utilisés pour nos expériences

Nom	Aptitude à la récolte	Expérience
WILIS	+++	3
IRIK	-	2
ENZO	+	2
ROKI	+++	1
SAM	-	3
SUMO	-	1
BINO	+	1
AJAX	-	1
ALCAPONE	-	1
BOB	++	1

**Aptitude à la récolte :** - récolte difficile, + récolte correcte, ++ récolte facile, +++ récolte très facile

**Tableau II :** Nomenclature en fonction de la concentration du sperme humain (40)

	Concentration de l'éjaculat
Polyzoospermie	Supérieur à 250 x 10 <sup>6</sup> / ml
Normozoospermie	Entre 20 et 250 x 10 <sup>6</sup> / ml
Oligozoospermie légère	Entre 10 et 20 x 10 <sup>6</sup> / ml
Oligozoospermie modérée	Entre 5 et 10 x 10 <sup>6</sup> / ml
Oligozoospermie sévère	Inférieur à 5 x 10 <sup>6</sup> / ml
Azoospermie	Absence de spermatozoïde dans l'éjaculat

**Tableau III** : Caractéristique des éjaculats utilisés pour l'expérience

Chiens	Volume (ml)	Mobilité individuelle	Mobilité massale	Vitalité	Concentration (Spz/ml) 10 <sup>6</sup>
<b>WILIS</b>	1	4/5	80%	76%	425
<b>ENZO</b>	2	4/5	70%	83%	642,5
<b>WILIS 1</b>	2	3/5	70%	70%	727
<b>ENZO1</b>	2	4/5	50%	65%	103,5
<b>WILIS 2</b>	1,89	4/5	70%	76%	888,5
<b>ROKI</b>	1	4/5	80%	90%	597,5
<b>BOB</b>	0,98	5/5	80%	77%	980
<b>BINO</b>	2,2	5/5	75%	88%	888

**Tableau IV** : Acceptabilités différences de 2 numérations en spermatozoïdes d'un même échantillon de sperme pour une somme donnée (33)

Somme	Acceptable
144-156	24
157-169	25
170-182	26
183-196	27
197-211	28
212-226	29
227-242	30
243-258	31
259-274	32
275-292	33
293-309	34
310-328	35

Somme	Acceptable
329-346	36
347-366	37
367-385	38
386-406	39
407-426	40
427-448	41
449-470	42
471-492	43
493-515	44
516-538	45
539-562	46
563-587	47

Annexe N°02 :



**Figure 01** : Etuve pour la stérilisation du matériel



**Figure 02**: bain marie une température de 37°C.



**Figure 03** : Le Sperme Class Analyzer® (SCA®)



**Figure 04** : microscope optique



**Figure 05 :** Vortex



**Figure 06 :** Micropipette



**Figure 07:** les

ambants



**Figure 08 :** Matériel de récolte (les cones et gel lubrefaint)