

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique  
Université Saad Dahlab-Blida -1-  
Faculté des sciences de la nature et de la vie  
Département de biologie des populations organiques  
Option : Biologie et physiologie de la reproduction



Mémoire de fin d'études en vue de l'obtention du diplôme  
**MASTER**

Thème

**Comparaison de plusieurs techniques d'évaluation de la concentration des spermatozoïdes bovins après cryoconservation**

Présenté par :

**Asma Slimani et Amina Benaziza**

Soutenu le :

**Devant le Jury**

Dr Guedioura. M	MCB	Univ. BLIDA1	<b>Président</b>
Dr Chaichi .W	MCA	Univ. BLIDA1	<b>Examineur</b>
Dr Belala.R	MCA	Univ. BLIDA1	<b>Promoteur</b>

**Promotion 2019-2020**

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique  
Université Saad Dahlab-Blida -1-  
Faculté des sciences de la nature et de la vie  
Département de biologie des populations organiques  
Option : Biologie et physiologie de la reproduction



Mémoire de fin d'études en vue de l'obtention du diplôme  
**MASTER**  
Thème

**Comparaison de plusieurs techniques d'évaluation de la mobilité et la  
concentration des spermatozoïdes bovins après cryoconservation**

Présenté par :

**Asma Slimani et Amina Benaziza**

Soutenu le :

**Devant le Jury**

Dr Guedioura. M	MCB	Univ. BLIDA1	<b>Président</b>
Dr Chaichi .W	MCA	Univ. BLIDA1	<b>Examineur</b>
Dr Belala.R	MCA	Univ. BLIDA1	<b>Promoteur</b>

**Promotion 2019-2020**

## Remerciements

*Louange à DIEU, le Tout Miséricordieux, le Très Miséricordieux de nous avoir aidé à finir ce modeste travail.*

***A notre encadreur le Docteur Belala Redha,**  
Qui a dirigé ce travail et veillé à ce qu'il soit mené à terme.  
Nous tenons surtout à vous remercier pour vos conseils qui nous ont été très utiles.*

***A Mr Guedioura. M***

*Qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de notre jury de thèse.  
Nous lui adressons, ici, l'expression de notre profond remerciement.*

***A Mme Chaichi***

*Qui a accepté de faire partie de notre jury de thèse,  
Sincères remerciements*

***A Monsieur saci Taib***

*Technicien de la plateforme biotechnologique.  
Merci infiniment.*

## **Dédicaces**

### **A ma chère maman,**

Autant de phrases aussi expressives soient-elles ne sauraient montrer le degré d'amour et d'affection que j'éprouve pour toi. Tu m'as comblé avec ta tendresse et ton affection tout au long de mon parcours. Tu n'as cessé de me soutenir et de m'encourager durant toutes les années de mes études. Ce travail est un témoignage de mon attachement et de mon amour. Puisse le tout puissant te donner santé, bonheur et longue vie afin que je puisse te combler à mon tour.

### **A mon très cher papa,**

Autant de phrases et d'expressions aussi éloquentes qu'elles soient ne sauraient exprimer ma gratitude et ma reconnaissance. Tu as su m'inculquer le sens de la responsabilité, de l'optimisme et de la confiance en soi face aux difficultés de la vie. Ta patience sans fin, ta compréhension et ton encouragement sont pour moi le soutien indispensable que tu as toujours su m'apporter. Je te dois ce que je suis aujourd'hui et ce que je serai demain et je ferai toujours de mon mieux pour rester ta fierté et ne jamais te décevoir. Que Dieu le tout puissant te préserve, t'accorde santé, bonheur, quiétude de l'esprit et te protège de tout mal.

### **A mon frère Réda,**

Pour toute l'ambiance dont tu m'as entouré, pour toute la spontanéité et ton élan chaleureux, Je te dédie ce travail. Puisse Dieu le tout puissant exhausser tous tes vœux.

### **A ma chère sœur Hanane,**

Ton encouragement et ton soutien étaient la bouffée d'oxygène qui me ressourçait dans les moments pénibles, de solitude et de souffrance. Merci d'être toujours à mes côtés, par ta présence, par ton amour dévoué et ta tendresse, pour donner du goût et du sens à notre vie de famille.

### **A ma très chère binôme Amina,**

Pour toute la complicité et l'entente qui nous unissent, en ce jour mémorable, pour moi ainsi que pour toi, reçoit ce travail en signe de ma vive reconnaissance et ma profonde estime.

**Slimani ASMA**

## **Dédicaces**

**Je remercie en premier lieu le Dieu qui m'a donné la santé, la patience et la volonté pour arriver à ce stade et à réaliser ce travail**

### **A ma Mère**

Femme d'honneur et de dignité, ton souci majeur est de voir réussir tes enfants. Ce travail est le fruit de tes conseils que vous n'avez cessé de prodiguer, de ton amour éternel porté à tes enfants et les nombreux sacrifices consentis. Tes encouragements et ton amour du travail bien fait ont sans cesse guidé mes pas et m'ont toujours servi de références.

Puisse le tout puissant veiller sur vous et vous accorder une longue vie et une santé de fer.

### **A mon père**

Ce travail est le fruit des nombreux efforts consentis pour ma formation. Vous m'avez toujours accordé votre amour, votre confiance et votre soutien en dépit des nombreux obstacles. Vous m'avez permis de croire à mes ambitions et donné les moyens de réaliser mes rêves.

Avec toute mon admiration, pour tout cela et plus encore, Merci.

Puisse le tout puissant veiller sur vous et vous accorder santé et longue vie.

### **A ma chère sœur**

Merci tout simplement d'être là, d'être toi.

Sache que je serai toujours là pour toi et je te souhaite que du bonheur dans ta vie.

### **A mes frères**

Abd elhak et Redhouene, merci pour leur amour fraternel et leur soutien.

Petit clin d'œil à Redouene qui m'a gentiment poussé à faire ce Master.

**A celui** qui était toujours présent pour moi et qui m'a beaucoup soutenue: mon fiancé Ahmed.

**A mes neveux et mes nièces** Anis, Nouha, Louay, Wail et Layane

**A mon beau frère** Djilali et **ma belle sœur** Faiza.

**A mes amies** et précisément Fadhila, Houda et Nora

### **A mon cher binôme**

Asma avec qui j'ai vécu de beaux moments au cours de cette année, ainsi qu'à sa famille.

**Bnaziza AMINA**

## Résumé

Le présent travail vise l'évaluation de l'efficacité d'un système CASA (pour Computer Aided Sperm Analyser) (Hamilton Thorn-IVOS II) à mesurer la concentration des spermatozoïdes dans des paillettes de semence bovine congelée, comparativement à la technique conventionnelle recommandée par l'OMS (Numération par l'hématimètre amélioré de Neubauer). Pour optimiser cet analyseur, deux facteurs pouvant influencer sur la mesure de la concentration sont étudiés, en l'occurrence la chambre d'analyse (i.e. la lame Leja® *versus* la cellule de Makler®) et pour chaque chambre le mouvement des spermatozoïdes (spermatozoïdes mobiles *versus* immobilisés).

Cinquante paillettes fines (0.25mL) de semence bovine produites par « le Centre Nationale d'Insémination Artificielle et d'Amélioration Génétique de Baba-Ali » sont décongelées, puis analysées par les cinq techniques citées ci-dessus et chaque analyse est répliquée cinq fois pour calculer le coefficient de variation (CV, %). Les données sont traitées par le logiciel « R » et une analyse de variance (ANOVA) permet la comparaison (n=50, p<0.05) entre les différentes techniques étudiées.

Sur la base des études précédentes effectuées sur la semence d'autres espèces animales, le système Hamilton Thorn-IVOS II pourrait représenter une bonne alternative à la technique conventionnelle dans l'évaluation de la concentration des spermatozoïdes bovins congelés en paillettes. Cet analyseur pourrait être optimisé par l'utilisation d'une chambre d'analyse capable de corriger l'effet Segré-Silberberg (Leja® 20µm) et par l'immobilisation des cellules spermatiques avant analyse, afin de prévenir le phénomène de collision et de diffraction des trajectoires de spermatozoïdes.

Cette technique d'analyse, une fois optimisée, présentera l'avantage d'être objective, automatisée, très rapide et de ce fait parfaitement adaptée au contexte du contrôle de qualité dans les centres de production de semence.

**Mots clés :** CASA, semence bovine, paillette, lame Leja®, cellule de Makler®.

## **Abstract**

The present work consists on evaluating the efficiency of CASA (HTM-IVOS II) in measuring the concentration of spermatozoa in bovine semen straws produced at the CNIAAG, compared th the reference technique recommended by the OMS (counting using of the Neubauer Cell).In the CASA analysis, two factors are varied , nemely the analysis chamber (i.e the Leja ® slide versus the Makler ® chamber) and the movement of spermatozoa (mobile versus immobilized cells).

FiFty bovine semen mini-straws producedthe national semen production centre in Algeria (CNIAAG) are used in this study, each straw is subjected to the five straws mentionned above and each test is replicated five times to calculate the coifficent of variance and evaluate the repeatability. The data are analysed by the «R» software for comparison between different tests using ANOVA. (n=50, p<0.05)

Based on the results of previous studies, ours could have suggested that the CASA system (Hamilton-Thorn IVOS II) represents a good alternative of the classical technique (Neubauer Cell) in evaluation of concentration of frozen bovine sperm in straws.

This analysis is optimized by a judisious choice of analysis chamber with suitable depth(slide Leja ® 20µm) and by immobilization of the sperm cells, thus separating the analysis of mobility and concentration measurment).

This analysis technique, once optimized, will have the advantage of beeing objective , automated, very fast and therefore perfectly suited to the context of quality control in semen production centers.

**Key words:** CASA, bovine semen , straw, Neubauer slide, Makler Cell.

## الملخص

يهدف العمل الحالي إلى تقييم كفاءة نظام CASA (HTM-IVOS II) في قياس تركيز الحيوانات المنوية في قصبية السائل المنوي للأبقار المنتجة في مركز CNIAAG مقارنة بتقنية الحساب باستعمال خلية نيوباور المتعارف عليها و الموصى بها من طرف المنظمة العالمية للصحة .OMS

في تحليل CASA ،يوجد عاملان مختلفان هما غرفة التحليل (أي شريحة® Leja مقابل خلية® Makler) وحركة الحيوانات المنوية (الخلايا المتحركة مقابل الخلايا المجمدة).

تم استخدام خمسين قصبية منوية بقرية من إنتاج مركز CNIAAG في هذه الدراسة. خضع كل منها للاختبارات الخمسة المذكورة أعلاه وتم تكرار كل اختبار خمس مرات من أجل حساب عامل التغير (%). وتقييم التكرار.

و قد تم تحليل البيانات بواسطة برنامج "R" للمقارنة بين الاختبارات المختلفة باستخدام (ANOVA, ن = 50، ف > 0.05).

بناءً على نتائج هذه الدراسات، كان من الممكن اقتراح ان نظام (Hamilton Thorne IVOSII) يمثل بديلاً جيداً للتقنية الكلاسيكية (Neubauer Cell) في تقييم تركيز الحيوانات المنوية البقرية المجمدة في القصبية يمكن تحسين هذا الاختبار عن طريق اختيار جيد لغرفة التحليل وعمق مناسب (شريحة® Leja 20 ميكرون) وعن طريق تجميد حركة الحيوانات المنوية، وبفصل تحليل الحركة عن قياس التركيز.

ستتمتع تقنية التحليل هذه، بمجرد تحسينها، بميزة كونها موضوعية وآلية وسريعة جداً وبالتالي فهي مناسبة تماماً لسياق مراقبة الجودة في مراكز إنتاج السائل المنوي.

**الكلمات المفتاح :** CASA , السائل المنوي للأبقار , قصبية , خلية نيوباور, خلية® Makler .



## Table des matières

Remerciements	
Dédicaces	
Dédicaces	
Résumé	
المخلص	
Abstract	
Sommaire	
Liste des tableaux	
Liste des figures	
Liste des abréviations	
Introduction.....	1
Chapitre I: Données bibliographiques	
I.Rappel anatomo-physiologique de l'appareil reproducteur du taureau.....	3
1.Rappels anatomiques de l'appareil génital du taureau.....	3
1.1.Partie glandulaire.....	3
1.1.1.Testicules.....	3
1.1.2.Enveloppes testiculaires .....	4
1.2. Partie excrétrice .....	5
1.2.1. Voies génitales.....	5
1.2.2. Voies uro-génitales.....	5
1.3.Glandes annexes.....	6
2. Physiologie de la reproduction.....	6
2.1. Structure du spermatozoïde.....	6
2.2.Etapes de la spermatogenèse.....	7
2.3. Contrôle hormonal de la spermatogenèse.....	8
2.4 Maturation finale du spermatozoïde et formation du sperme.....	10
2.4.1 Maturation finale.....	10
2.4.2 Composition du sperme.....	10

3.Etapes de la fécondité .....	11
3.1.La capacitation .....	11
3.2.La traversée de la couronne radiée.....	11
3.3.L'adhésion à la membrane pellucide .....	11
3.4.La réaction acrosomique.....	11
3.5.La traversée de l'aire pellucide.....	11
3.6.La pénétration du spermatozoïde dans l'ovocyte.....	12
II-Technologie de la semence .....	12
1.METHODES DE RECOLTE DU SPERME.....	12
1.1. La préparation des taureaux dans les centres de collecte.....	12
1.2. Le vagin artificiel .....	12
1.3. Technique de collecte de sperme au vagin artificiel.....	13
2. Préparation et conservation de la semence.....	15
2.1. Principe.....	15
2.2. Dilution.....	15
2.3. Refroidissement de la semence.....	15
2.4. Conditionnement de la semence.....	16
2.5.Conservation.....	16
2.6.Décongélation.....	17
3.Evaluation de la qualité de la semence.....	17
3.1. Examen macroscopique.....	17
3.2. Examen microscopique.....	17
3.2.1. Méthode manuelle.....	19
3.2.2. Méthode automatisée.....	20

## Chapitre II: Matériels et méthodes.

1. Problématique et objectif.....	21
2. Lieu d'étude.....	22
3. Collecte des paillettes.....	23
4. Décongélation des paillettes.....	23
5. Préparation des solutions de dilution et analyse de la semence.....	24
6. Techniques d'analyse de la semence.....	25
6.1. Numération par l'hématimètre type amélioré de Neubauer .....	25
6.1.1. Hématimètre type amélioré de Neubauer.....	25
6.1.2. Matériels utilisés.....	27
6.1.3. Étapes du comptage des cellules.....	27
6.1.4. Entretien de la chambre de comptage.....	32
6.2. L'analyse par le système CASA.....	32
6.2.1. Le système HAMILTON THORN IVOS II.....	32
6.2.2. Matériel utilisé.....	33
6.2.3. Méthode d'analyse .....	34
6.2.3.1. Remplissage de la chambre de comptage.....	34
6.2.3.2. Etapes de l'analyse.....	35
7. Étude statistique.....	36
7.1. Collecte et présentation des données brutes.....	36
7.2. Analyse statistique des données.....	36
Chapitre III: Résultats et discussion.....	37
Conclusion.....	43
Recommandations.....	44
Références bibliographiques.	

## Liste des tableaux

**Tableau 1 :** Grille de notation de la motilité massale.....18

**Tableau 2 :** Différences acceptables entre deux comptes de répliation pour une somme donnée sur la base de l'intervalle de confiance arrondi à 95%.....32

## Liste des figures

<b>Figure 1</b> : Schéma anatomique des organes génitaux du taureau.....	3
<b>Figure 2</b> : Coupe transversale du testicule et de ses enveloppes.....	4
<b>Figure 3</b> : Conformation du pénis de taureau.....	5
<b>Figure 4</b> : Schéma d'un spermatozoïde de taureau.....	6
<b>Figure 5</b> : Représentation schématique de la spermatogénèse.....	7
<b>Figure 6</b> : Schéma des différentes composantes de l'axe hypothalamo-hypophyso-testiculaire.....	9
<b>Figure 7</b> : Représentation schématique du vagin artificiel.....	13
<b>Figure 8</b> : Classification des anomalies morphologiques majeures et mineures des spermatozoïdes.....	19
<b>Figure 9</b> : CASA IVOS II .....	20
<b>Figure 10</b> : Plateforme Biotechnologique en Reproduction des Carnivores.....	22
<b>Figure 11</b> : Laboratoire d'analyse.....	22
<b>Figure 12</b> : Un laboratoire de congélation de semence.....	23
<b>Figure 13</b> : Décongélateur de Paillettes.....	24
<b>Figure 14</b> : Coupe-paillette adapté.....	24
<b>Figure 15</b> : Hématimètre amélioré de Neubauer.....	26
<b>Figure 16</b> : Détails de la grille de la cellule de Neubauer.....	26
<b>Figure 17</b> : Photo de la cellule de Neubauer.....	27
<b>Figure 18</b> : Matériels nécessaire pour le comptage des cellules.....	27
<b>Figure 19</b> : Homogénéisation de la suspension pendant 10min.....	28
<b>Figure 20</b> : Remplissage de la cellule de Neubauer.....	29
<b>Figure 21</b> : La mise en place de la cellule sur le microscope.....	29

<b>Figure 22</b> : Les spermatozoïdes à compter.....	30
<b>Figure 23</b> : Comptage avec concentration cellulaire élevée.....	30
<b>Figure 24</b> : compteur manuel de laboratoire.....	31
<b>Figure 25</b> : L'analyseur HAMILTON THORN IVOS II.....	33
<b>Figure 26</b> : Le matériel utilisé pour faire une évaluation à l'aide du CASA.....	34
<b>Figure 27</b> : La chambre Makler®.....	34
<b>Figure 28</b> : Les étapes de remplissage de la lame Leja® et la chambre de Makler® respectivement.....	35
<b>Figure 29</b> : La mise en point de l'échantillon.....	35
<b>Figure 30</b> : Les étapes de mesure par le CASA.....	35

## Liste des abréviations

**ABP:** Androgen Binding Protein.

**AMH:** Anti-Müllerian Hormone.

**ANOVA:** Analysis of Variance.

**CASA:** Computer-Aided Sperm Analysis.

**CNIAAG :** Centre National d'Insémination et d'Amélioration Génétique.

**CPS :** Centre de Production de Semence.

**CQ :** Control de Qualité.

**CV :** Coefficient de Variance.

**Eau PPI :** Eau Pour Préparation Injectable.

**Fps:** Frame per seconde.

**Hz :** Hertz.

**IA :** Insémination Artificielle.

**Moy :** Moyenne.

**OMS :** Organisation mondiale de la santé.

**SCA:** Sperm Class Analyser.

**SEM:** Standard Error of the Mean.

**SPZ:** Spermatozoïde.



# **Introduction**



## Introduction

L'insémination artificielle (IA) bovine est la première génération des biotechnologies reproductives introduite en Algérie durant l'époque coloniale (en 1945). Elle représente un outil d'amélioration génétique de notre cheptel bovin par diffusion (1 taureau produit 300-900 doses d'IA) du matériel génétique des races exotiques plus performantes à travers l'importation de semences congelées et la production locale de semence à partir de taureaux importés (Bouyer, 2006 ; Laghrour, 2012 ; Goularte, 2018).

Le succès de l'IA dépend en grande partie de la qualité du sperme récolté puis cryoconservé. L'évaluation de la qualité spermatique s'impose systématiquement dans le contexte d'un contrôle de qualité (CQ) au sein des centres de production de semence (CPS). Les points d'appui de ce CQ comprennent entre autres plusieurs caractéristiques spermatiques ayant un impact direct sur la fertilité (Vincent *et al.*, 2015).

Parmi ces caractéristiques, la concentration en spermatozoïdes dans une paillette représente un paramètre clé qui est fortement corrélé à la fertilité *in vivo* (Mohanty *et al.*, 2018). La valeur usuelle pour le nombre de spermatozoïdes dans une paillette produite oscille entre 10 et 20 millions cellules, toute chute de ce nombre de spermatozoïdes sera associée à une baisse considérable de la fertilité (Mohanty *et al.*, 2018).

En effet, il existe plusieurs moyens d'évaluer la concentration spermatique, à savoir la numération microscopique au moyen d'un hématimètre qui représente la méthode conventionnelle. La cellule Neubauer de type amélioré représente l'hématimètre recommandé par l'organisation mondiale de la santé (OMS, 2010). Cependant, cette technique semble être très contraignante en matière de temps si elle est appliquée selon les recommandations de l'OMS (temps moyen estimé : 15mn). Cette contrainte s'avère être incompatible avec le contrôle de qualité systématique dans un centre de production intensive de semence où l'on doit contrôler 3 paillettes tirées au hasard de chaque éjaculat, totalisant 60 et 90 paillettes pour 20 à 30 taureaux récoltés dans la journée. En plus du contrôle immédiat après congélation, ces paillettes devront être évaluées trimestriellement pendant leur stockage en azote liquide (Goularte, 2018).

L'analyseur CASA (pour computer aided sperm analysis) est un système intégré qui, grâce à un logiciel d'analyse d'image (algorithmes) peut reconstituer les trajectoires individuelles des spermatozoïdes et effectuer une analyse informatique pour générer plusieurs caractéristiques cinétiques reflétant la qualité du mouvement de ces spermatozoïdes. Ce système permet donc d'évaluer la mobilité des spermatozoïdes avec une grande objectivité comparée à l'œil humain (la microscopie optique) qui demeure très subjectif. Ce système mesure aussi la concentration

spermatique au même temps que la mobilité, et le temps moyen par analyse ne dépasse pas quelques secondes, ce qui représente un grand intérêt dans le contexte d'un CQ au sein des centres de production intensive de semence.

Cependant, si ce système s'avère être fiable pour l'analyse de la mobilité spermatique, il n'existe pas 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 conventionnelle (Maes *et al.*, 2010 ; Fdailainne, 2017 ; Tahloult *et al.*, 2019 ; Shubert *et al.*, 2019).

Ces limites du système CASA peuvent être dues à plusieurs facteurs tenant aux erreurs humaines de manipulation, aux algorithmes d'analyse informatique du système (IVOS II) aux caractéristiques physiques du sperme et au phénomène d'agglutination, et surtout au mouvement des spermatozoïdes (étant donné que le système mesure la concentration au même temps que la mobilité) ainsi qu'au choix de la chambre d'analyse et de sa profondeur exprimée en  $\mu\text{m}$  (Maes *et al.*, 2010 ; Vincent *et al.*, 2015 ; Brito *et al.*, 2016).

Ainsi, l'objectif de notre étude est d'évaluer l'efficacité du système CASA (HTM-IVOS II) à mesurer la concentration des spermatozoïdes dans des paillettes de semence bovine congelée comparativement à la technique conventionnelle (Numération par l'hématimètre de Neubauer). En vue d'optimiser cette technique, deux chambres d'analyse sont comparées (i.e. la lame Leja® *versus* la cellule de Makler®) et pour chaque chambre deux conditions d'analyse (spermatozoïdes mobiles *versus* immobilisés).

Ce mémoire, débute par une introduction, suivie d'une partie théorique ou « données bibliographiques » puis une partie pratique ou expérimentale et finit par une conclusion et des recommandations. La partie expérimentale se scinde en deux chapitres à savoir « matériel et méthodes » et « résultats et discussion ».

Malheureusement, la conjoncture sanitaire liée à la pandémie de COVID-19 que connaît notre pays ainsi que le monde entier nous a empêché de faire la réalisation pratique de notre travail selon le protocole détaillé dans le chapitre « matériel et méthode ». Ainsi, en l'absence de résultats personnels à discuter dans le chapitre « résultats et discussion », nous nous sommes penchés sur l'analyse de la littérature en nous basant sur les études ayant le même objectif que nous et les conditions expérimentales les plus proches de notre protocole.

# **Chapitre I: Données bibliographiques**

# I. Rappel anatomo-physiologique de l'appareil reproducteur du taureau

## 1. Rappels anatomiques de l'appareil génital du taureau

L'appareil génital du taureau (figure 1) est constitué par l'ensemble des organes chargés de l'élaboration du sperme et de son dépôt dans les voies génitales de la femelle (BARONE, 2001).

Le tractus génital du taureau comprend trois parties : (HAZEN, 2010)

- une partie glandulaire composée des testicules et des enveloppes testiculaires (scrotum, dartos, gaine vaginale et crémaster) (figure 2).
- une partie excrétrice représentée par les voies génitales (épididymes et conduits déférents) et les voies uro-génitales (urètre, pénis).
- les glandes annexes (prostate, glandes vésiculaires, glandes bulbo-urétrales) développées autour de la portion pelvienne de l'urètre. Ces glandes accessoires mêlent leurs produits de sécrétion au fluide testiculaire pour constituer le sperme.

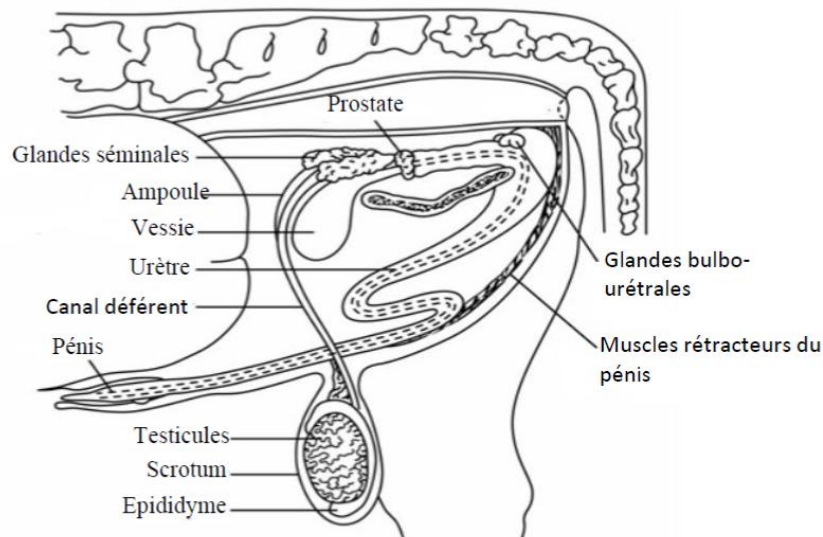


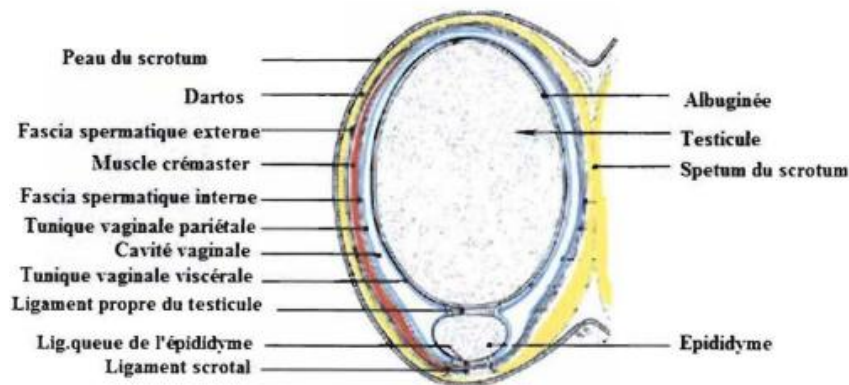
Figure 1 : Schéma anatomique des organes génitaux du taureau (Zsuppan *et al.*, 2015)

### 1.1. Partie glandulaire

#### 1.1.1. Testicules

Les testicules (figure 2) sont des organes ovoïdes, bilobés, de couleur blanchâtre et de consistance ferme, suspendus dans le scrotum sous la région inguinale. Les testicules ont une origine mésonéphrotique. Chez le taureau, ils descendent dans les enveloppes testiculaires avant même la naissance, vers trois à quatre mois de la vie embryonnaire. Les testicules sont pourvus d'une fonction exocrine ou spermatique et d'une fonction endocrine (synthèse de l'androgène par les cellules de Leydig, synthèse d'œstrogènes, de l'Anti-Müllerian Hormone (AMH), de

l'Androgen Binding Protein (ABP) et de l'inhibine par les cellules de Sertoli). Le testicule est recouvert par une membrane fibreuse, résistante, non élastique appelée albuginée. Cette dernière délivre une série de lames conjonctives qui le subdivisent en lobules logeant le tissu parenchymateux et qui servent de support aux éléments vasculo-nerveux. Elle est à l'origine de la couleur blanche des testicules. Des travées conjonctives convergent vers la face postérieure du testicule pour former le corps d'Highmore où arrivent les canalicules issus des tubes séminifères qui s'y anastomosent et forment le rete testis. (CHENOWETH *et al.* 2007).



**Figure 2 : Coupe transversale du testicule et de ses enveloppes**

**(BARONE, 2001)**

Les testicules ont une longueur variant entre 10 à 12 cm de long pour 6 à 8 cm de large, leur taille variant néanmoins en fonction de l'âge et de la race (Barone, 2001). En général, ce sont des organes non symétriques : le gauche un peu plus bas ou plus caudal que le droit. Cette disposition associée à la grande mobilité au sein des enveloppes prévient de la compression réciproque lors de l'adduction des cuisses. (Hopper *et al.*, 2015)

### **1.1.2. Enveloppes testiculaires**

Les enveloppes testiculaires (figure 2) encore appelées bourses, sont formées par un ensemble de six membranes. Il y a deux membranes superficielles constituées par le scrotum et le dartos, trois membranes en profondeur formées par le crémaster, la fibreuse et la séreuse vaginale, en fin la tunique celluleuse et les ligaments qui stabilisent les testicules dans leurs enveloppes (DRION *et al.*, 1993). Les enveloppes testiculaires soutiennent et protègent les testicules, les voies spermatiques qui leur sont accolées (épididyme, canal déférent) et les vaisseaux sanguins qui les irriguent. Cependant, leur principal rôle est d'assurer la thermorégulation des testicules, essentielle au bon déroulement de la spermatogénèse. (EDUCAGRI, 2005)

## 1.2. Partie excrétrice

### 1.2.1. Voies génitales

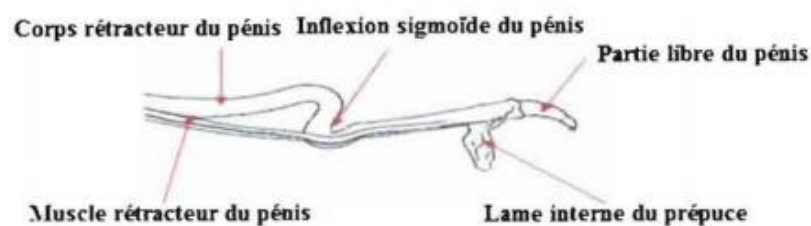
- L'épididyme est un corps allongé le long du bord postérieur du testicule auquel il fait suite chez les ruminants (figure 2). Il est constitué d'un épithélium pseudo-strié et de nombreuses microvillosités. L'épididyme est composé de trois parties que sont: la tête, le corps et la queue. Chez le taureau, la durée du transit épидидymaire des spermatozoïdes est de 9 à 13 jours (HAZEN, 2010).

-Le canal déférent est en continuité avec le canal épидидymaire. C'est un tube musculaire dont le péristaltisme permet de propulser les spermatozoïdes de l'épididyme dans l'urètre lors de l'éjaculation (Barone, 2001).

### 1.2.2. Voies uro-génitales

- l'urètre est un canal impair allant de la vessie au méat urinaire et servant de passage pour le sperme lors de l'éjaculation et l'urine pendant la miction. La longueur de l'urètre peut atteindre 100 à 120 cm chez un taureau adulte. Il comporte deux parties que sont: l'urètre pelvien situé dans la cavité pelvienne et l'urètre pénien situé dans le pénis. Chez le taureau, l'urètre a la particularité de présenter un trajet en S : c'est le S pénien (figure 1 et 3.). Il contribue à l'allongement du pénis lors de l'érection. (Frandsen *et al.*, 2009)

- le pénis représente l'organe copulateur du taureau. Sa longueur varie selon les races et peut atteindre 80 à 110 cm de long (HAZEN, 2009-2010). Il se forme par tubulation et élongation du tubercule génital. Le pénis comprend trois parties: la racine du pénis, le corps du pénis et l'extrémité libre du pénis. Il est irrigué par les artères caverneuses et les artères dorsales de la verge et le sang est repris par les veines honteuses externes. Le pénis est recouvert (protégé) par un étui cutané, le fourreau encore appelé prépuce riche en glandes sécrétrices de phéromones. (EDUCAGRI, 2005)



**Figure 3: Conformation du pénis de taureau.**

**(PAREZ et DUPLAN, 1987)**

### 1.3. Glandes annexes

Elles sécrètent le liquide séminal qui se déverse dans les voies excrétrices lors de l'éjaculation et se mélange aux spermatozoïdes pour former le sperme. Les glandes annexes sont représentées par la prostate, les vésicules séminales et les glandes de Cowper (Frandsen *et al.*, 2009).

## 2. Physiologie de la reproduction

### 2.1. Structure du spermatozoïde

Le spermatozoïde est le gamète mâle. C'est une cellule de petite taille (70 à 80  $\mu\text{m}$  de longueur) hautement différenciée et longuement flagellée dont la caractéristique principale est la motilité (Frandsen *et al.*, 2009).



**Figure 4 : Schéma d'un spermatozoïde de taureau (Ball *et al.*, 2004)**

Comme représenté sur la figure 4 ci-dessus, le spermatozoïde peut être divisé en trois parties caractéristiques :

- **La tête** : elle est composée de deux structures. Le noyau, haploïde et de forme aplatie, l'occupe quasi-entièrement (Barone, 2001). Il contient une chromatine très compacte grâce à des protéines spécifiques : les protamines spermatiques (Hafez *et al.*, 2000). L'acrosome coiffe proximale ce noyau. C'est un petit sac délimité par une double membrane qui contient des enzymes telles que l'acrosine, ainsi que de l'acide hyaluronique jouant un rôle important dans la fertilisation. (Hafez *et al.* 2000)





Les spermatocytes I entrent ensuite en première division de méiose pour former des spermatocytes II (Figure 5). Cette première division de méiose divise par deux le nombre de chromosomes cellulaires, on obtient donc des spermatocytes II haploïdes qui vont former à la suite de la deuxième division de méiose des spermatides (Staub et Johnson ,2018). Cette étape de méiose assure une diversité génétique des gamètes mâles grâce aux recombinaisons génétiques (L'Hernault, 2001).

La spermiogénèse est l'étape de différenciation des spermatides (Hopper,2015). Elle comprend la formation de l'acrosome qui contient des enzymes hydrolytiques nécessaires à la pénétration de l'ovocyte lors de la fécondation, l'élongation de la cellule, la formation du flagelle et la condensation de la chromatine nucléaire. (Goldberg et Zirkin,2018)

La spermatogénèse évolue par cycles de l'épithélium séminifère (Hess et de Franca,2009). En effet, les nouvelles spermatogonies commencent leur cycle de divisions cellulaires et s'engagent dans le processus de différenciation à intervalles de temps constants. C'est pourquoi les coupes de tubes séminifères représentent toujours les mêmes associations de différenciation cellulaire. La durée d'un cycle de division dans l'épithélium du tube séminifère est de 13,5 jours alors que la durée totale de la spermatogénèse est de 61 jours, soit 4,5 fois la durée d'un cycle. (Staub et Johnson ,2018)

### **2.3. Contrôle hormonal de la spermatogénèse**

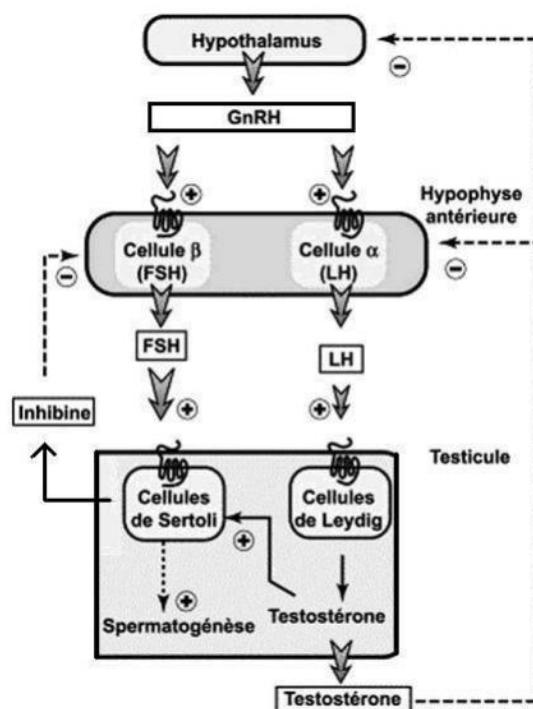
La régulation hormonale de la spermatogénèse s'organise, tout comme chez les femelles, autour de l'axe hypothalamus-hypophyse-gonades : la synthèse de LH et FSH par l'adénohypophyse est sous le contrôle de la GnRH, synthétisée de manière pulsatile par l'hypothalamus (figure 6) (Ball *et al.*, 2004).

La testostérone produite par les cellules de Leydig sous stimulation de la LH est essentielle à la spermatogénèse (Goldberg et Zirkin ,2018). Elle permet notamment le maintien du nombre basal de spermatogonies, l'intégrité de la barrière hémotesticulaire (O'Hara et Smith ,2015), l'entrée en méiose et assure la survie des spermatocytes (O'Shaughnessy,2014). Cependant, les récepteurs à la testostérone ne sont pas exprimés directement par les cellules germinales, son action est donc médiée par les cellules de Sertoli (O'Hara et Smith ,2015). De plus, la testostérone assure le développement des glandes sexuelles accessoires, stimule l'apparition des caractères sexuels secondaires et le comportement sexuel du mâle (Hafez *et al.*,2000). Enfin, elle exerce un rétrocontrôle négatif sur l'axe hypothalamo-hypophysaire (figure 6). (Amann,1983)

La FSH, quant à elle, a une action directe sur les cellules germinales mais aussi une action sur les cellules de Sertoli (figure 6) (Hafez *et al.*, 2000). Elle permet l'initiation de la spermatogénèse et, chez l'adulte, le maintien d'une quantité suffisante de cellules germinales produites. Elle augmente aussi le nombre de spermatogonies et jouerait un rôle dans leur entrée en méiose. Son mécanisme d'action demeure néanmoins imprécis (O'Shaughnessy, 2014).

Les interactions complexes entre les cellules de Sertoli et les cellules germinales en différents stades de différenciation sont cruciales dans la régulation de la spermatogénèse (Goldberg et Zirkin, 2014). Les cellules de Sertoli sécrètent de l'inhibine qui exerce un rétrocontrôle négatif sur la synthèse de FSH, il semblerait que l'inhibine joue aussi un important rôle paracrine sur la spermatogénèse. Les cellules de Sertoli produisent et sécrètent deux glycoprotéines dans la lumière des tubules. Ces glycoprotéines agissent sur la différenciation et la maturation des spermatozoïdes. Cette synthèse est régulée par la FSH et elle permet, combinée à la testostérone, de maintenir une haute concentration d'androgènes dans le tube séminifère ce qui facilite le développement et la maturation des cellules lors de la spermatogénèse (Hopper *et al.*, 2015).

La production hormonale est essentielle à la spermatogénèse et donc à la fertilité du taureau. Néanmoins, l'âge, la nutrition et le stress sont aussi des facteurs de variations essentiels à prendre en compte lors d'un défaut de spermatogénèse chez le taureau. (Schlatt et Ehmcke, 2014)



**Figure 6 : Schéma des différentes composantes de l'axe hypothalamo-hypophyso-testiculaire. (Quang Nhuan, 2002)**

## **2.4. Maturation finale du spermatozoïde et formation du sperme**

### **2.4.1. Maturation finale**

La spermiation correspond au phénomène de séparation entre la spermatide différenciée et la cellule de Sertoli ce qui aboutit à la formation d'un spermatozoïde libre immature dans la lumière du tube séminifère. Cette étape est caractérisée par la perte d'une partie du cytoplasme du spermatozoïde, phagocyté par la cellule de Sertoli (Hafez *et al.*, 2000).

Après sa formation, le spermatozoïde est transporté par péristaltisme le long de l'épididyme où il subit une maturation lui permettant d'acquérir son pouvoir fécondant (Hafez *et al.*, 2000). Des modifications à la fois morphologiques, essentiellement par déshydratation, et métaboliques permettent une augmentation de la motilité. Cette maturation est sous dépendance hormonale des androgènes (Ball *et al.*, 2004) et dure en moyenne 7 jours mais peut être réduite de 10 à 20% en cas d'augmentation de la fréquence des éjaculations (Hafez *et al.*, 2000). Les spermatozoïdes sont ensuite stockés dans la queue de l'épididyme et la partie proximale du canal déférent (Ball *et al.*, 2004). La durée de la spermatogenèse chez le taureau étant d'environ 61 jours, et le transit épидидymaire de 7 jours (Staub et Johnson, 2018), les spermatozoïdes retrouvés dans l'éjaculat ont donc été produits dans les testicules environ deux mois et demi plus tôt.

### **2.4.2. Composition du sperme**

Le sperme est composé d'une partie cellulaire, les spermatozoïdes, et d'une partie liquidienne, le plasma séminal. Ce dernier est constitué majoritairement par les sécrétions des glandes annexes et des cellules de Sertoli. Il contient principalement du fructose, des hormones stéroïdes et des protéines et possède un pH variant de 6,4 à 7,8 (Hafez *et al.*, 2000). Il joue à la fois un rôle de milieu de transport, de nutrition mais aussi de protection des spermatozoïdes (Ball *et al.*, 2004).

Le volume de l'éjaculat chez le taureau est en moyenne de 5 à 6 mL (Bonnes et Batellier, 2005) mais il existe une variation individuelle importante (de 1 à 15 mL) (Ball *et al.*, 2004). De même, sa concentration moyenne en spermatozoïdes est de 1,2 milliards/mL mais elle possède une fourchette de variation entre 0,5 à 2,5 milliards/mL (Bonnes et Batellier, 2005). Elle tend notamment à augmenter avec l'âge du taureau (Brito *et al.*, 2002), jusqu'à 72 mois environ et à diminuer avec la fréquence des éjaculations. (Fuerst-Waltl *et al.*, 2006)

### **3. Etapes de la fécondité**

#### **3.1. La capacitation**

Les spermatozoïdes subissent la capacitation dans les voies génitales femelles : ils achèvent leur maturation et acquièrent leur pouvoir fécondant. Des enzymes protéolytiques produites par les voies génitales femelles libèrent les sites de reconnaissance de l'ovocyte, jusque-là masqués lors du passage dans l'épididyme. Des remaniements membranaires interviennent, en particulier la diminution du ratio cholestérol/phospholipide qui rend la membrane plasmique très instable et rend possible l'exocytose de l'acrosome. (Thibault, 2001 ; Heymon et Vignon, 2005)

#### **3.2. La traversée de la couronne radiée**

La présence de hyaluronidases membranaires sur le spermatozoïde facilite l'insertion de ce dernier entre ces cellules qui sont « soudées » entre elles par un ciment riche en acide hyaluronique. De plus, la pénétration des spermatozoïdes à travers cette barrière cellulaire folliculaire est facilitée par la dissociation partielle du ciment intercellulaire sous l'action de l'enzyme sécrétée par la paroi antérieure de l'oviducte (Thibault, 2001 ; Heymon et Vignon, 2005).

#### **3.3. L'adhésion à la membrane pellucide : fixation initiale**

La reconnaissance des gamètes se réalise par l'intermédiaire des glycoprotéines de la zone pellucide (ZP) et des protéines de surface du spermatozoïde (protéines CRISP ou cysteine-rich secretory proteins, P34H, zonadhésines, spermadhésines) (Thibault, 2001 ; Heymon et Vignon, 2005).

#### **3.4. La réaction acrosomique**

La réaction acrosomique se produit suite à la fixation du spermatozoïde sur la membrane pellucide. Il y a fusion progressive de la membrane plasmique et de la membrane acrosomique externe du spermatozoïde. Ceci donne lieu à la formation de « fenestration » au travers desquelles le contenu de l'acrosome est libéré. (Thibault, 2001 ; Heymon et Vignon, 2005)

#### **3.5. La traversée de l'aire pellucide**

Le spermatozoïde qui a effectué la réaction acrosomique traverse l'aire pellucide plus ou moins obliquement. A la suite de la capacitation, le spermatozoïde acquiert une mobilité renforcée qualifiée d'hypermobilité : la forte poussée du flagelle et le mouvement cisailant de la tête permettent une pénétration mécanique du spermatozoïde au sein de la zone pellucide. Cependant

cette mobilité n'est pas suffisante en elle-même pour assurer la traversée, et nécessite la libération des enzymes (hyaluronidase et acrosine) par l'acrosome pour « déstabiliser » la membrane pellucide et faciliter ainsi le passage du spermatozoïde (Thibault, 2001 ; Heymon et Vignon, 2005)

### **3.6. La pénétration du spermatozoïde dans l'ovocyte**

Le spermatozoïde entre en contact avec les microvillosités de l'ovocyte qui s'allongent, et emprisonnent le spermatozoïde et le maintiennent pendant la fusion. Le cytoplasme de l'ovocyte englobe le noyau du spermatozoïde et la région antérieure dans sa globalité. Le flagelle est en règle générale incorporé mais dégénère rapidement. (Thibault, 2001 ; Heymon et Vignon, 2005)

## **II-Technologie de la semence**

### **1. Méthode de récolte du sperme**

Dans les centres de production de semence, le sperme des taureaux est le plus souvent collecté au vagin artificiel. L'obtention d'une semence de qualité avec cette technique nécessite une bonne préparation des taureaux préalablement à la collecte.

#### **1.1. La préparation des taureaux dans les centres de collecte (Gérard et Khirredine,2002).**

Avant chaque collecte, les taureaux sont amenés dans la salle de monte et attachés dans les stalles d'attente où ils peuvent voir la collecte de sperme des autres taureaux. Lors de la préparation passive, la libido des taureaux est stimulée par voyeurisme et par le conditionnement : la reconnaissance des bruits, des odeurs propres à la salle de monte.

La préparation active consiste à promener le taureau et à l'amener au contact des boutes en train. Les boutes en train sont des taureaux éliminés de la production pour des raisons génétiques et qui sont gardés en raison de leur robustesse et de leur docilité, les vaches étant interdites des centres de production de semence pour des raisons sanitaires et de sécurité. Lorsque le taureau présente des signes d'excitation (érection, flehmen...), le taurellier lui fait effectuer plusieurs fausses montes. Elles consistent à laisser le taureau monter sur le boute en train sans lui laisser le temps de donner le coup de rein concomitant de l'éjaculation.

Les taureaux réalisent en moyenne deux fausses montes avant d'être récoltés au vagin artificiel mais leur nombre varie en fonction du centre de production de semence et du taureau. La connaissance de chaque animal et de ses habitudes permet d'effectuer une bonne préparation.

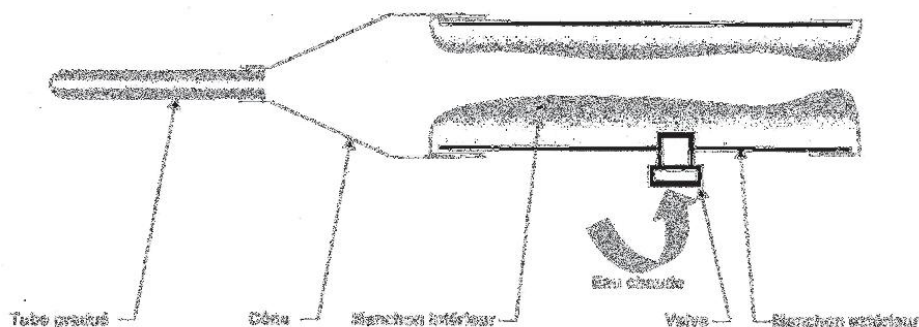
#### **1.2. Le vagin artificiel**

Le principe du vagin artificiel est de reproduire l'ensemble des sensations présentées par les voies génitales femelles lors du coït (chaleur, pression, lubrification), et de recueillir rapidement un éjaculat total et non souillé (Dumont, 1997).

Le matériel est constitué d'un cylindre de caoutchouc rigide (manchon extérieur), d'une trentaine de centimètres de long et d'un diamètre intérieur de 5 cm. Il est doublé à l'intérieur d'une capote amovible et gonflable (manchon intérieur), également en caoutchouc.

La paroi qui le constitue est donc double et peut être remplie d'eau ou d'air à l'aide d'une valve extérieure. Lors du prélèvement, le vagin est prolongé d'un cône en silicone (25 cm de long) à l'extrémité duquel est fixé le tube de collecte. Ce dernier est protégé des chocs mécaniques, thermiques et de la lumière par un manchon opaque et isolant.

L'ensemble du vagin lorsqu'il est prêt à être utilisé est lui-même isolé thermiquement. Après utilisation, il est entièrement démonté pour être lavé, séché et désinfecté. (Gérard et Khirredine, 2002)



**Figure 7 : Représentation schématique du vagin artificiel (D'après Quint, 2004)**

### **1.3. Technique de collecte de sperme au vagin artificiel**

Avant chaque utilisation, les vagins sont maintenus dans une étuve à une température de 45°C. L'eau présente dans la paroi du vagin permet de maintenir une certaine pression et une température du vagin d'environ 42°C lors de la collecte. Si la température de l'eau est trop élevée, l'organe copulateur peut être lésé et le taureau peut refuser la collecte.

Les vagins sont sortis de l'étuve au dernier moment, lorsque le préleveur estime que le taureau est suffisamment préparé. La capote interne du vagin artificiel est plus ou moins gonflée en fonction des habitudes du taureau. L'intérieur du vagin est lubrifié avec de la vaseline ou un gel gynécologique.

Le taurellier laisse alors le taureau monter sur le bote en train. Le préleveur s'accole au taureau, il dévie son pénis en érection dans le vagin artificiel en le saisissant à travers le fourreau. Ce simple contact suffit en général à déclencher le saut et l'éjaculation qui ne durent que quelques secondes. L'opérateur retourne ensuite le vagin artificiel et le sperme s'écoule dans le tube collecteur. (Dumont, 1997 ; Gérard et Khirredine, 2002)

Les intérêts de la collecte au vagin artificiel sont les suivants :

**-Qualité de la semence :**

La collecte au vagin artificiel donne un éjaculat naturel, induit par une libido nécessaire et suffisante, et produit par un comportement physiologiquement proche du coït. C'est pourquoi elle permet d'obtenir le meilleur sperme possible à un moment donné.

**-Observation de la capacité à saillir du taureau :**

Dans le cadre d'un contrôle de fertilité, la collecte au vagin artificiel permet d'apprécier l'aptitude à la saillie du taureau, qui est fonction de la libido du taureau et de ses capacités à sauter et à introduire le pénis dans le vagin (érection et intromission).

Les limites de la collecte au vagin artificiel sont les suivantes :

-La principale limite est l'incapacité à collecter les taureaux qui refusent de donner le coup de rein concomitant de l'éjaculation qui est nécessaire à la collecte au vagin artificiel : certains taureaux peuvent se montrer récalcitrants à la collecte au vagin artificiel pour des raisons variables : pathologies de l'appareil locomoteur, stress provoqué par la présence humaine, manque de docilité, faible libido.

Les taureaux des centres de production de semence sont entraînés et habitués à être collectés au vagin artificiel. Les taureaux en ferme ne sont pas habitués à la monte en main. C'est pourquoi la collecte au vagin artificiel en ferme ne peut se faire que sur des taureaux suffisamment dociles. Elle nécessite également la présence de vaches en chaleur au moment de la collecte, ce qui entraîne la contention et la manipulation d'animaux supplémentaires.

Une alternative à la méthode de collecte classique au vagin artificiel est l'utilisation d'un vagin artificiel interne. Le dispositif est constitué d'un cylindre de caoutchouc inséré et fixé dans le vagin d'une vache en chaleur le jour de la collecte. Après la saillie de la vache ainsi équipée, le vagin artificiel est retiré et la semence est récupérée pour être analysée. Les inconvénients principaux sont : le coût élevé lié à l'utilisation de femelles boute en train, la transmission possible de maladies vénériennes et surtout l'incapacité à collecter certains taureaux pourtant aptes à se reproduire mais qui vont refuser le saut le jour de la collecte.

L'efficacité du vagin artificiel interne a été testée lors d'évaluations de la fonction reproductrice des taureaux et comparée à une récolte de semence par électro-éjaculateur (Barth et al., 2003). 50 à 70% des taureaux en production ont pu être récoltés au vagin artificiel interne, alors que la semence est obtenue systématiquement lors des collectes à l'électro-éjaculateur.

L'avantage principal est que le vagin artificiel interne permet d'observer la capacité à saillir des taureaux en même temps qu'il permet d'obtenir un échantillon de semence de l'animal. Des études ont montré que lors d'évaluations classiques de l'aptitude à la reproduction des taureaux, c'est-à-dire basées sur l'utilisation d'un électro-éjaculateur ; un taureau sur 5 est déclaré

satisfaisant alors qu'il est en réalité incapable de saillir (Blockey, 1980). L'autre avantage est la sécurité de l'opérateur lors de la collecte, par rapport à une collecte avec un vagin artificiel classique.

## **2. Préparation et conservation de la semence**

### **2.1. Principe**

La semence est le sperme préparé (dilué - conditionné - conservé) par une technique appropriée en vue de son emploi en insémination artificielle. En effet, un éjaculat contient un nombre de spermatozoïdes supérieur à ce qui est requis pour une insémination. Selon plusieurs auteurs rapportés par **(Traore,1996)**, au moment de l'insémination, une paillette doit contenir au minimum 8-10 millions de spermatozoïdes mobiles après décongélation, selon le même auteur, il a été admis qu'une paillette de semence bovine doit contenir au moins 15 à 20.10<sup>6</sup> spermatozoïdes avant congélation. Prenant en compte les pertes liées à la congélation et à la décongélation, certains auteurs préconisent la concentration de 30 à 40.10<sup>6</sup> spermatozoïdes par dose au conditionnement. Ainsi, la préparation de la semence a pour objectifs :

- D'accroître le volume (dilution) de telle façon qu'un plus grand nombre de femelles puissent être inséminées.
- De protéger les spermatozoïdes pour qu'ils puissent supporter sans dégradation la succession des opérations de refroidissement, congélation et décongélation.
- De conditionner et conserver une dose individuelle qui servira à l'insémination de la vache.

### **2.2. Dilution**

Le milieu de dilution doit être non toxique pour les spermatozoïdes, cryoprotecteur et doit réduire le développement microbien. Ainsi, les substances bactéricides ou bactériostatiques : Sulfanilamide (0,3 %), la pénicilline (500 à 1000 UI/ml), la streptomycine (1mg/ml) sont additionnées aux milieux de dilution. Les milieux les plus utilisés sont à base de lait préchauffé, écrémé et dont le pouvoir protecteur est accru avec addition de 10% de jaune d'œuf de poule et d'antibiotique, ou à base de solution de citrate de sodium (2,9%) additionné au jaune d'œuf (25%).

Dans l'optique de limiter tous les risques possibles de transmission des pathologies entre espèce, l'utilisation des milieux de dilution synthétiques est de plus en plus courante.

Le taux de dilution dépend de la concentration en spermatozoïdes souhaitée dans la dose de semence, du volume et de la concentration en spermatozoïdes de l'éjaculat prélevé.

### **2.3. Refroidissement de la semence**

Pour éviter la détérioration de la qualité de la semence, la température est abaissée jusqu'à +4°C. Le métabolisme des spermatozoïdes est ainsi réduit. Le refroidissement peut se faire pendant ou après la dilution.



La vitesse de refroidissement doit être rapide pour réduire au maximum la durée du passage dans la zone critique de température mais aussi suffisamment lente pour éviter le choc thermique. La température de +4°C est obtenue après un refroidissement progressif en une heure à 30 minutes maximum, dans une vitrine réfrigérée.

#### **2.4. Conditionnement de la semence**

Il consiste à fractionner la semence en doses fécondantes destinées à être utilisées à court, moyen ou long terme. La forme de conservation la plus courante et la plus pratiquée reste les paillettes. Ce sont des tubules spéciaux en matière plastique creusés avec des volumes de 0,25 ou 0,5ml. Elles sont ouvertes sur un côté avec 2 boules de coton pour pousser la semence.

L'autre côté est soudé automatiquement après remplissage de la paillette par une machine de remplissage et de soudage. Lorsque la semence est destinée à une utilisation lointaine, la paillette fait l'objet d'une identification. Elle va porter ainsi les renseignements sur la traçabilité de la semence (le nom du géniteur, race, numéro de code, date de récolte, N° de récolte, centre ou lieu de production, etc.)

#### **2.5. Conservation**

La conservation est fonction du mode d'utilisation de la semence. Ainsi :

- Pour une utilisation directe, les semences en paillettes sont maintenues dans un bain-marie (thermos) à la température de 36-38°C ;
- Pour une utilisation de la semence dans 24 à 48 h, la semence peut se conserver au frais.

Les dilueurs utilisés permettent la conservation du pouvoir fécondant des spermatozoïdes à +4°C pendant 46 à 72 heures ;

- pour une utilisation à long terme, après le conditionnement, la conservation de la semence se fait dans une bonbonne contenant de l'azote liquide à – 196°C.

La congélation est progressive et peut se faire à l'aide de machines spécialisées ou de façon manuelle. Les paillettes sont d'abord congelées à -140°C au-dessus d'une vapeur d'azote liquide pendant 9 minutes, puis plonger dans l'azote liquide.

Après quelques jours, un test de congélabilité de la semence est réalisé avant sa conservation. C'est un test de vitalité des spermatozoïdes après décongélation renvoyant à l'examen de motilité individuelle. Si la semence présente une bonne congélabilité, elle est retenue.

Afin de garantir une semence de bonne qualité, un contrôle doit être effectué avant et après congélation des paillettes. Le procédé initial utilisé dans la plupart des centres de production de semences consiste à estimer la concentration de la semence en spermatozoïdes par un hémocytomètre ou par un spectrophotomètre mais aussi à estimer la viabilité des spermatozoïdes par la méthode classique de la coloration éosine/nigrosine (Donoghue *et al.*, 1996) (Fernández-Gago *et al.*, 2013).

## **2.6. Décongélation**

La décongélation doit prendre en compte trois paramètres : la température, le temps et la solution de décongélation. En pratique, la température de bain marie utilisée est de 35 à 40°C, la durée de décongélation est de l'ordre de 30 secondes à 2 minutes. On peut envisager des lavages afin d'extraire le glycérol du milieu et de revenir à des conditions isotoniques afin d'éviter une altération des membranes des spermatozoïdes et des anomalies de flagelles c'est la méthode qui a été utilisée par (Hopskins *et al.*, 1988).

## **3. Evaluation de la qualité de la semence**

Elle consiste à apprécier les caractéristiques du sperme collecté, notamment celles en relation avec le pouvoir fécondant et les technologies de conditionnement. L'examen sémiologique de l'éjaculat comprend un examen visuel (macroscopique), un examen microscopique et une évaluation par test métabolique ou test de résistance (Konfe ,2014)

### **3.1. Examen macroscopique**

L'examen macroscopique se réalise immédiatement après la récolte. C'est un examen visuel subjectif qui permet d'évaluer l'aspect général et le volume du sperme. A l'observation, la couleur du sperme doit être de blanc crémeux à jaunâtre. Toute coloration rouge à marron est anormale et doit faire suspecter la présence de sang ou d'hémoglobine. De même, toute couleur grisâtre peut être le témoin de la présence de pus (Pietremont,1995). L'opacité doit, elle aussi, être évaluée. Elle est corrélée d'une part à la concentration en spermatozoïdes et d'autre part à la présence d'éléments étrangers (pus ou sang). (Manciaux L, Chambon, 2011 ; Menon *et al.*, 2011)

### **3.2. Examen microscopique**

L'examen microscopique du sperme regroupe l'évaluation de différents paramètres. La motilité et la morphologie des spermatozoïdes, en particulier, font partie des indicateurs les plus importants pour prédire de la fertilité d'un taureau (Utt, 2016).

#### **▪ La concentration**

Elle est évaluée par comptage direct des spermatozoïdes à l'aide d'une cellule hématimétrique ou par mesure au spectrophotomètre. En monte naturelle, une concentration minimale de 300000 spermatozoïdes/mL est nécessaire pour considérer le taureau comme fertile (Pietremont,1995).

### ▪ La motilité massale

La motilité massale est l'examen qualitatif le plus rapide et le plus informatif (Manciaux L, Chambon,2011). Il s'agit d'une observation au microscope à faible grossissement (x40) (Dumont,1997) d'une goutte de sperme frais déposée sur une lame maintenue à une température de 37°C. Elle évalue le mouvement de l'ensemble des spermatozoïdes (Bordas,1988). L'échelle de notation varie de 0 à 5 en fonction des mouvements, l'objectif étant d'obtenir une note supérieure ou égale à 3 (tableau 1) (Kastelic et Thundathil, 2008).

**Tableau 1 : Grille de notation de la motilité massale (Manciaux et Chambon,2011)**

Note	Caractérisation des mouvements
0	Absence totale de mouvements
1	Mouvements légers
2	Mouvements nets sans vague
3	Début de vagues
4	Vagues très nettes
5	Tourbillons

### ▪ La motilité individuelle ou progressive

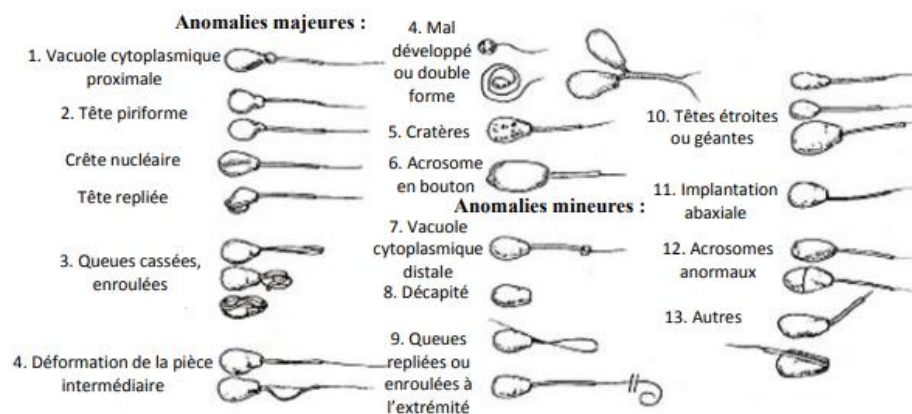
Pour évaluer la motilité individuelle, le sperme est dilué entre 10 et 40 fois dans une solution tampon. Contrairement à la motilité massale, l'observation microscopique doit se faire avec un grossissement d'au moins (x400). La motilité progressive correspond au pourcentage de spermatozoïdes doués d'une motilité propre et traçante c'est-à-dire ayant une trajectoire rectiligne et un déplacement rapide (Dumont,1997). L'objectif pour un sperme fertile est une motilité progressive d'au moins 30%. (Kastelic et Thundathil, 2008)

### ▪ Le pourcentage de spermatozoïdes morts

L'évaluation de ce paramètre nécessite une coloration. Il existe différents types de colorants utilisables comme par exemple l'éosine ou la nigrosine. Les spermatozoïdes morts perdent leur intégrité membranaire et de ce fait fixent le colorant dans leur cytoplasme. Ceci permet de les différencier et de pouvoir les compter (Dumont,1997). L'objectif est d'avoir moins de 25 % de spermatozoïdes morts dans l'échantillon de sperme analysé. (Manciaux et Chambon,2011)

## ▪ La morphologie des spermatozoïdes

La morphologie est évaluée par observation microscopique à l'immersion d'un sperme préalablement coloré. Elle doit être réalisée sur au moins 100 spermatozoïdes voire plus de 300 si plusieurs malformations sont identifiées (Kastelic et Thundathil, 2008). Les malformations morphologiques des spermatozoïdes sont classées par site (tête, queue, pièce intermédiaire, acrosome), par origine (primaire : testicules, secondaires : épидидyme, tertiaire : glandes accessoires ou post éjaculation) et aussi selon leur impact sur la fertilité du taureau. (Parkinson,2004)



**Figure 8 : Classification des anomalies morphologiques majeures et mineures des spermatozoïdes (Dumont,1997).**

### 3.2.1. Méthode manuelle

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

### 3.2.2. Méthode automatisée

#### **Evaluation par l'utilisation d'un système CASA (Computer Assisted Semen Analysis) :**

Les importantes variations liées à l'évaluation subjective de la mobilité des spermatozoïdes au microscope ont incité les chercheurs à développer des systèmes d'évaluation objectifs et standardisés, les systèmes d'analyse de la semence assistée par ordinateur ou systèmes CASA.

Le système CASA est une méthode d'analyse de sperme informatisée qui permet d'obtenir des informations objectives et précises sur la proportion de spermatozoïdes mobiles et leur mouvement. Le système détecte les mouvements des spermatozoïdes et suit chaque spermatozoïde séparément dans le temps et l'espace.

Cette méthode a donc l'avantage d'estimer plus précisément la mobilité d'un grand nombre de spermatozoïdes en un minimum de temps, et cela de façon assez simple, après un paramétrage minutieux. De plus, elle peut être utilisée sur de la semence fraîche mais également sur semence réfrigérée ou encore congelée/décongelée (Allimant 2010).

Le système Hamilton-Thorn est 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 et l'utilisation facultative d'une illumination fluorescente et d'un fluorochrome de l'ADN spermatique afin de distinguer les cellules de tout autre objet ambigu.



**Figure 9 :** CASA IVOS II (cliché issu de chez IMV technologies).

## **Chapitre II: Matériels et méthodes**

## 1.Problématique et objectif

Le succès de l'insémination artificielle bovine dépend en grande partie de la qualité initiale du sperme récolté sur les taureaux mais aussi de sa qualité après cryoconservation. Il est donc impératif de disposer de techniques analytiques fiables, précises et rapides dans le cadre du contrôle de qualité systématique au sein des centres de production de semence bovine.

La mesure de la concentration des spermatozoïdes est un paramètre primordial dans une analyse qualitative de sperme. Sa détermination repose conventionnellement sur le comptage visuel avec un hématimètre qui est la méthode de comptage la plus répandue. Cependant, cette dernière nécessite beaucoup de temps et d'effort pour son exécution en plus de sa subjectivité liée à l'erreur humaine, ce qui la rend incompatible au contexte de contrôle de qualité notamment pour les centres de production intensive de semence.

Le système CASA a été utilisé précédemment pour la mesure de la concentration spermatique chez différentes espèces et des résultats erronés par sous et surestimation ont été rapportés dans la littérature. Ces limites seraient dues à plusieurs facteurs dont notamment le choix de la chambre d'analyse et le mouvement des spermatozoïdes. Cette technique pourrait être une bonne alternative à la méthode conventionnelle à condition d'être parfaitement optimisée en maîtrisant les facteurs capables d'influer sur la mesure de la concentration.

Ainsi notre objectif est d'évaluer l'efficacité du système CASA (HTM-IVOS II) à mesurer la concentration des spermatozoïdes dans des paillettes de semence bovine comparativement à la méthode conventionnelle recommandée par l'OMS (Numération au moyen de la cellule de Neubauer). En vue d'optimiser cette technique, deux chambres d'analyse sont comparées (i.e. la lame Leja ® *versus* la cellule de Makler ®) et pour chaque chambre deux conditions d'analyse (spermatozoïdes mobiles *versus* immobilisés).

## 2. Lieu d'étude :

Notre présent travail, est prévu d'être réalisé au niveau de la Plate-forme Biotechnologique en Reproduction des Carnivores de l'université SAAD DAHLAB de Blida1.



**Figure 10 : Plate-forme Biotechnologique en Reproduction des Carnivores.**

La plate-forme est composée de :

- Une salle d'attente et une salle de consultation.
- Un laboratoire d'analyse de la semence (figure 11).
- Un laboratoire de congélation de semence (figure 12).
- Une banque de semence.
- Une salle d'échographie et d'endoscopie.
- Un bloc de chirurgie.
- Une salle de production d'azote et enfin le magasin.



**Figure 11 : Laboratoire d'analyses.**





**Figure12 : Un laboratoire de congélation de semence.**

### **3. Collecte des paillettes :**

Notre étude est effectuée sur cinquante paillettes fines (0.25ml) de semence bovine recueillies auprès du CNIAAG à Baba Ali.

Les paillettes sont transportées dans un container de transport de 2 litres jusqu'à la banque de semence de la plate-forme biotechnologique en reproduction des carnivores de l'université de Blida1, où elles sont conservées dans un container de stockage avec une surveillance permanente du niveau d'azote liquide jusqu'à analyse.

### **4. Décongélation des paillettes :**

Les paillettes sont décongelées au fur et à mesure de notre capacité de prise en charge des analyses de la semence ainsi que leurs répétitions.

La décongélation est faite à 37°C pendant 30secondes à l'aide d'un décongélateur de paillettes présenté en « Figure 13 » (IMV-Technologies, Aigles, France). A l'issue, les paillettes sont récupérées, parfaitement séchées avec du sopalin puis coupées à leur extrémité bouchée au moyen d'un coupe-paillette adapté « Figure 14 » (IMV-Technologies, Aigles, France).

La semence est récupérée sur un cône Eppendorf préchauffé (+37°C) en introduisant le mandrin métallique d'un pistolet d'IA dans la paillette et poussant le bouchon en coton jusqu'à l'extrémité. Ce procédé nous permet de récupérer la totalité des cellules spermatisques notamment les cellules qui se décantent sur la paroi après plusieurs heures d'équilibration à +4°C (minimum 4H) en position horizontale avant congélation.



**Figure 13 : Décongélateur de Paillettes. (IMV-Technologies, Aigles, France)**



**Figure 14 : Coupe-pailleterie adapté. (IMV-Technologies, Aigles, France)**

### **5. Préparation des solutions de dilution et analyse de la semence :**

Après décongélation, chaque tube Eppendorf contenant un volume utile de 220 $\mu$ L de semence (Paillette fine : volume théorique 0.25mL et volume utile 0.22mL) sera répartie sur deux autres tubes Eppendorf contenant chacun 110 $\mu$ L d'un dilueur Tris-Glucose (pour conserver la mobilité des spermatozoïdes) ou d'une solution saline hypertonique « NaCl 4% » (pour immobiliser les cellules spermatiques).

La solution NaCl 4% est obtenue en ajoutant 4g de NaCl à 80 ml d'eau PPI dans une fiole jaugée à 100 ml. La solution est mélangée à l'aide d'un agitateur magnétique jusqu'à complète dissolution, puis le volume est ajusté à 100 ml après retrait du baromètre aimanté qui est remis ensuite pour une dernière homogénéisation. La solution finale est filtrée à l'aide d'un filtre-seringue de 0.45 micron puis conservée à +4°C pour une durée maximale d'une semaine.

Le dilueur Tris-Glucose utilisé dans notre travail est synthétisé au laboratoire à base de 3.025g de Tris (tri-hydroxyméthyl-aminométhane), 1.7g d'acide citrique et 1.25g de glucose dans 100ml d'eau PPI. La solution finale est filtrée à l'aide d'un filtre-seringue de 0.45 micron puis conservée à +4°C pour une durée maximale d'une semaine.

La semence diluée (1/2) dans la solution saline hypertonique (tube1) et le Tris-Glucose (tube2) sera soumise à une évaluation de la concentration des spermatozoïdes au moyen de cinq tests différents à savoir :

- 1- Numération par l'hématimètre type amélioré de Neubauer (Spz immobilisés).
- 2-Analyse par HAMILTON THORN IVOS II avec Chambre Makler® 10µm (Spz mobiles) .
- 3- Analyse par HAMILTON THORN IVOS II avec Chambre Makler® 10µm (Spz immobilisés).
- 4-Analyse par HAMILTON THORN IVOS II avec Lame Leja® 20µm (Spz mobiles).
- 5- Analyse par HAMILTON THORN IVOS II avec Lame Leja® 20µm (Spz immobilisés).

La numération par hématimètre type amélioré de Neubauer est considérée dans notre étude comme étant la méthode de référence (Gold Standard) selon les dernières recommandations de l'OMS, elle servira alors de témoin positif.

Les différentes analyses CASA représentent les techniques expérimentales évaluées dans notre étude en variant deux facteur à savoir la chambre d'analyse (Makler® versus Leja®) et la mobilité spermatique (spz mobile versus Spz immobile). Cette combinaison de facteur constitue un factoriel 2x2.

## **6. Techniques d'analyse de la semence**

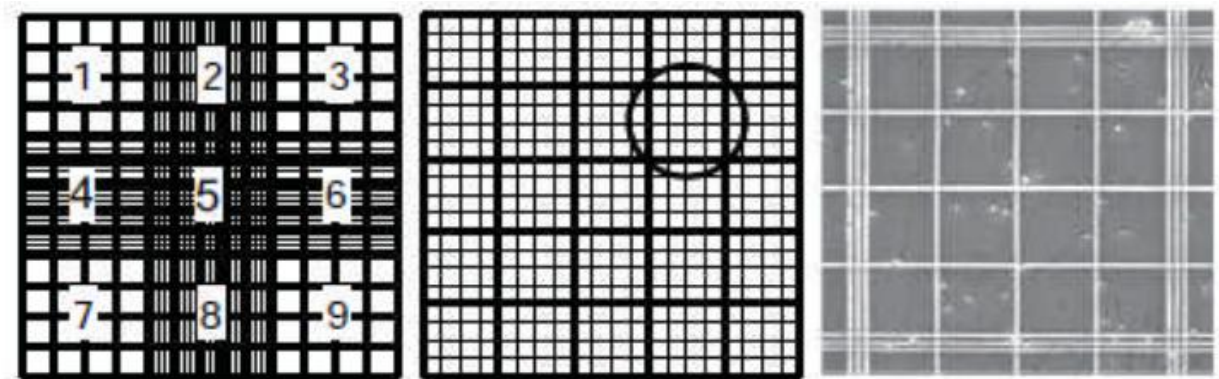
### **6.1. Numération par l'hématimètre type amélioré de Neubauer**

Malgré les développements technologiques qui ont eu lieu dans les laboratoires scientifiques durant ces dernières années, le comptage visuel avec un hématimètre reste la méthode de Comptage la plus répandue et la plus fiable depuis le 21ème siècle.

#### **6.1.1. Hématimètre type amélioré de Neubauer**

L'hématimètre type amélioré de Neubauer comporte deux chambres de comptage distinctes (figure 17), chacune présentant un motif microscopique de lignes de quadrillage de 3 mm x 3mm gravées sur la surface du verre. Il est utilisé avec une lamelle spéciale épaisse (numéro d'épaisseur 4, 0,44 mm) qui repose sur les grilles, elle est soutenue par des piliers de verre situés

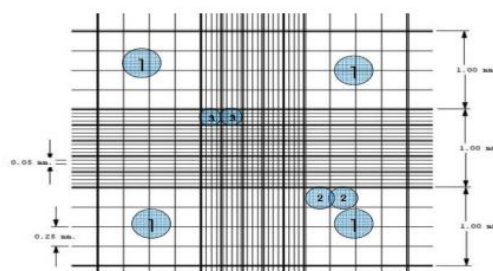
à 0,1 mm au-dessus du sol de la chambre. Chaque zone de comptage est divisée en neuf grilles de 1 mm x 1 mm. Ces réseaux sont désignés par les numéros indiqués à la (figure15) (Guide de OMS 2010).



**Figure 15 : Hématimètre amélioré de Neubauer. (Brazil et al. ,2004)**

Esquisses de la zone inscrite montrant : les neuf grilles dans une chambre de l'hématimètre (panneau de gauche) la grille centrale numéro 5 (la figure 15) de 25 carrés de 0,2mm x 0,2mm (panneau central) et micrographie d'une partie d'une chambre remplie (panneau de droite), montrant l'une des 25 carrés de la grille centrale (le carré entouré du panneau central) délimités par des lignes triples et contenant 16 carrés de 0,05mm x0,05mm. Avec une profondeur de 100  $\mu$ m, chaque grille contient 100  $\mu$ l. Quatre de ces grilles (1, 3, 7 et 9) contiennent quatre rangées de quatre carrés, chacune contient 6,25  $\mu$ l, deux grilles (2 et 8) contiennent quatre rangées de cinq carrés, chacune de 5 $\mu$ l, deux grilles (4 et 6) contiennent cinq rangées de quatre carrés. Chacune contient 5  $\mu$ l et la grille centrale (numéro 5) contient cinq rangées de cinq carrés (Figure 16).

En fonction de la dilution et du nombre de spermatozoïdes comptés, différentes zones de la chambre sont utilisées pour déterminer la concentration en spermatozoïdes (Guide de OMS, 2010).



**Figure 16: Détails de la grille de la cellule de Neubauer.(OMS,2010)**



**Figure 17 : Photo de la cellule de Neubauer.**

### **6.1.2. Matériels utilisés :**

Les éléments nécessaires pour réaliser un comptage de cellule avec un hématimètre sont les suivants : (figure18)

- A.** Un échantillon à mesurer (40 $\mu$ l de semence).
- B.** Hématimètre type amélioré de Neubauer.
- C.** Microscope optique avec contraste de phase.
- D.** Micropipettes.
- E.** Le vortex.



**Figure 18 : Matériels nécessaire pour le comptage des cellules.**

### **6.1.3. Étapes du comptage des cellules:(d'après le guide de l'OMS 2010).**

#### **ETAPE 1 : Préparation de l'échantillon.**

Un volume de 40ul est pipeté directement dans le cône Eppendorf contenant la semence diluée (1/2) avec la solution NaCl 4% puis chargé dans l'hématimètre de Neubaeur.

#### **Etape 2 : Introduction de l'échantillon dans la cellule de Neubauer.**

On met le couvre-objet sur la plaque de Neubauer, et on le dispose d'une façon horizontale sur la table, à un endroit où il est facile de manipuler la pipette.

1- On place un embout jetable à l'extrémité de la micropipette.

2- On Mélange soigneusement la suspension, en la faisant tourbillonner pendant 10 secondes à la vitesse maximale (figure 19).



**Figure 19 : Homogénéisation de la suspension pendant 10min.**

3- On ajuste la micro pipette pour aspirer 40  $\mu$ L de liquide immédiatement pour éviter la sédimentation des spermatozoïdes.

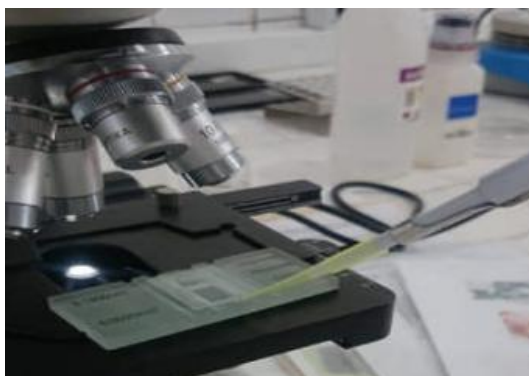
4- On appuie sur le piston de la pipette doucement jusqu'à ce que le piston arrive à la fin de son parcours.

5- On fait sortir la pointe de la pipette de l'échantillon, et on la maintient toujours en position verticale pour l'emmener jusqu'à la cellule de Neubauer.

6- On met la pointe de la pipette au bord du couvre-objet, à l'extrémité de la plaque de Neubauer. Il s'agit de laisser le liquide pénétrer entre la plaque et le couvre-objet depuis le côté, par capillarité.

7- On relâche le piston doucement et on vérifie que le liquide entre correctement et uniformément dans la plaque. (Figure 20)

8- Si des bulles apparaissent, ou le couvre-objet a bougé ou toute autre anomalie, on répète l'opération.



**Figure 20 : Remplissage de la cellule de Neubauer.**

### **ETAPE 3 : Préparation et réglage du microscope.**

On met la cellule de Neubauer sur la platine du microscope (Figure 21).

On règle le microscope jusqu'à ce qu'on voie nettement les spermatozoïdes en observant à un grossissement x200 ou x400.

On Cherche le premier cadre où on va réaliser le comptage. Pour cet exemple, nous allons compter le grand carré central de la cellule de Neubauer.



**Figure 21 : la mise en place de la cellule sur le microscope.**

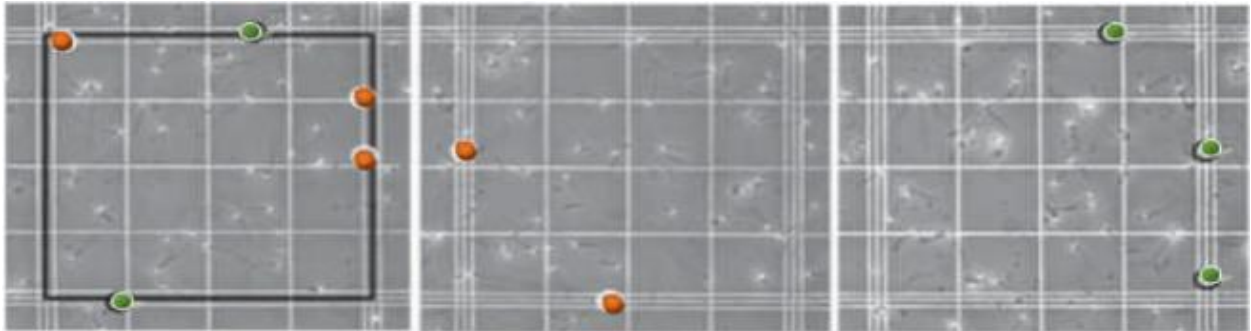
### **ETAPE 4 : Calculer le nombre total de spermatozoïdes.**

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

Il faut compter au moins 200 spermatozoïdes dans chaque répliquât, afin d'obtenir une erreur d'échantillonnage acceptable (voir le tableau 2) (Guide de OMS 2010).

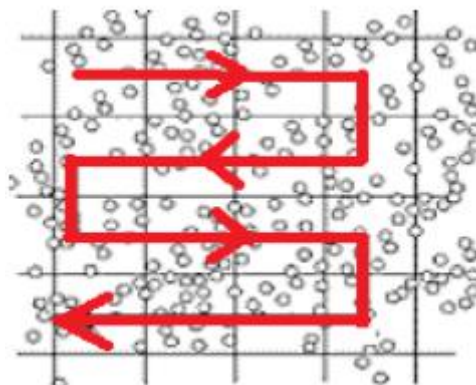
On commence par évaluer la grille centrale (numéro 5). On ne compte que les spermatozoïdes entiers (à tête et à queue).

Le milieu des trois lignes définit la limite du carré (ligne noire. Panneau de gauche). On compte tous les spermatozoïdes du carré central, ainsi que ceux dont la tête est entre les deux lignes intérieures (**cercles orange**). Mais pas ceux dont la tête est située entre les deux lignes extérieures (**cercles vert**). Un spermatozoïde dont la majeure partie de la tête repose sur la ligne centrale est compté uniquement si cette ligne est la ligne inférieure ou gauche du carré (**cercles orange**, panneau du milieu), mais pas s'il s'agit de la ligne supérieure ou droite du carré. (**Cercles vert**, panneau de droite) (figure 22) (Guide de OMS 2010).



**Figure 22 : Les spermatozoïdes à compter. (Brazil *et al.* ,2004)**

Il est facile de se perdre dans le comptage, donc on compte en forme de zigzag comme le décrit la (Figure 23) en passant ligne par ligne.



**Figure 23 : Comptage avec concentration cellulaire élevée (OMS, 2010).**

On continue à compter jusqu'à au moins 200 spermatozoïdes, présents dans une rangée complète (de cinq grands carrés) a été examinée. Le comptage doit être fait par lignes complètes, ne pas s'arrêter au milieu d'une ligne. Si 200 spermatozoïdes ne sont pas observés dans les cinq rangées de la grille centrale, continuez à compter dans les rangées (de 4 grands carrés) des deux grilles adjacentes (carré 4 et 6).



On note le nombre de lignes évaluées pour atteindre au moins 200 SPZ. Le même nombre de lignes sera compté à partir de l'autre chambre de l'hématimètre. On compte le nombre de spermatozoïdes et des rangées à l'aide d'un compteur de laboratoire (Figure 24)



**Figure 24: compteur manuel de laboratoire**

On note sur une feuille les résultats de la quantité de cellules comptées dans le cadre centrale de la première chambre, ainsi que le nombre des lignes.

On passe à la deuxième chambre de l'hématimètre et on effectue le comptage de répliquât sur le même nombre de lignes (le même volume) que celui de la première chambre, même si cela produit moins de 200 spermatozoïdes.

#### **ETAPE 5: Calcul de la concentration**

- On calcule la somme et la différence des deux chambres (somme des N).
- On détermine l'acceptabilité de la différence à l'aide du tableau 4. (Chacun montre la différence maximale entre les comptes qui devraient se produire dans 95% des échantillons uniquement à cause d'une erreur d'échantillonnage).
- Si la différence est acceptable, on calcule la concentration. Si la différence est trop élevée, on prépare une nouvelle dilution, et on répète les numérations.
- Le nombre de spermatozoïdes comptés 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 :  $N/n \times (1/20) \times \text{facteur de dilution}$

**Tableau 2 :** Différences acceptables entre deux comptes de réplication pour une somme donnée sur la base de l'intervalle de confiance arrondi à 95%.  
(OMS,2010)

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

#### 6.1.4. Entretien de la chambre de comptage :

On nettoie la chambre de l'hématimètre et la lamelle avec de l'eau et on laisse sécher soigneusement après utilisation, car tout résidu séché peut empêcher le chargement.

En frottant la grille de la surface, on enlèvera tous spermatozoïdes résiduels de l'échantillon précédent.

On fait tremper les chambres et les lamelles réutilisables pendant la nuit dans un désinfectant pour éviter toute contamination par des agents potentiellement infectieux dans le sperme.

## 6.2. L'analyse par le système CASA

### 6.2.1. Le système HAMILTON THORN IVOS II

Le système CASA est une méthode d'analyse de sperme informatisée qui permet d'obtenir des informations objectives et précises sur la proportion de spermatozoïdes mobiles et leurs mouvements (figure 25).

Le système détecte les mouvements des spermatozoïdes et suit chaque spermatozoïde séparément dans le temps et l'espace.

Les paramètres pouvant être calculés avec cette technique sont nombreux :

- Le pourcentage de spermatozoïdes mobiles **MOT**.
- Le pourcentage de mobilité progressive **PMOT**.
- Le pourcentage des spermatozoïdes fléchants (dont la trajectoire a des caractéristiques supérieures à une vitesse et une linéarité du mouvement prédéfinie)
- L'amplitude des mouvements latéraux de la tête des spermatozoïdes pendant leur déplacement **ALH**.
- La vitesse moyenne de déplacement linéaire **VSL**.
- La vitesse curviligne **VCL** (la vitesse mesurée sur la distance totale parcourue).
- La fréquence des rythmes de croisements des trajectoires **BCF**.
- La moyenne des déplacements angulaires **MAD**.

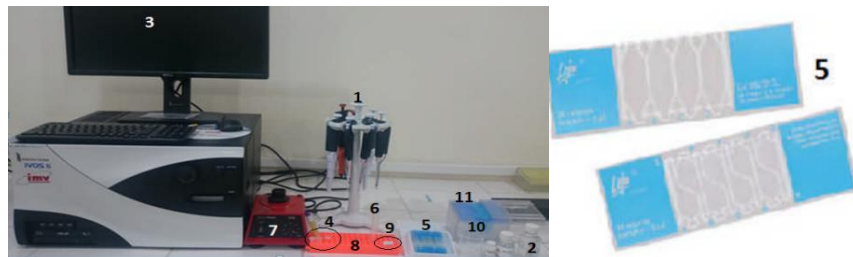


**Figure 25: HAMILTON THORN IVOS II.**

### 6.2.2. Matériel utilisé : (figures 26, 27)

- 1) Micropipettes.
- 2) Diluants (NaCl 4% ou la solution vitale).
- 3) Le système d'analyse de la semence assisté par ordinateur CASA (HAMILTON THORN IVOS II).
- 4) Eppendorf.
- 5) La Lame de comptage Leja® (20 µm) et la chambre de Makler®(10µm).
- 6) Un échantillon de la semence.

- 7) Vortex.
- 8) Portoir.
- 9) Baromètre aimanté.
- 10) Bécher gradué.
- 11) L'embout.



**Figure 26: Le matériel utilisé pour faire une évaluation à l'aide du CASA.**



**Figure 27 : La chambre Makler®  
(Microptics, 2018)**

### **6.2.3. Méthode d'analyse : (Iguer-Ouada M, Verstegen JP; 2001)**

#### **6.2.3.1. Remplissage de la chambre de comptage :(Figure 28).**

On a devant nous deux échantillons dont l'un est dilué avec du NaCl 4% et l'autre avec le dilueur Tris-Glucose.

- a) Appuyer sur le bouton « load » pour faire sortir le porte lame (plage slot).
- b) Placer la lame et la fixer.
- c) Tourbillonner l'échantillon pendant 10s à l'aide du vortex.
- d) A l'aide d'une micropipette, aspirer un petit volume (5µl) de la semence.

e) Placer la pointe de l'embout de la micropipette sur le bord de la chambre avec un angle de 45° formé par l'axe de la micropipette et la lame.

f) Verser doucement la semence dans la chambre, puis cette dernière va se remplir par capillarité « 3µl » dans la lame Léja®, pour la chambre Makler® on met les 5µl de semence et remet le couvercle « couvre-objet ».

h) Appuyer de nouveau sur le bouton « load » pour charger la lame.

Chaque analyse est répliquée 5 fois.



**Figure 28 : Les étapes de remplissage de la lame Leja® et la chambre Makler® respectivement.**

### 6.2.3.2. Etapes de l'analyse :

1. Faire la mise au point. (Figure 29).
2. Saisir toutes les informations : espèce animale, immatriculation, lignée génétique, numéro de paillette, le volume, le milieu.
3. Régler le nombre des captures (10 captures).
4. Cliquer sur capture auto.
5. Les résultats sont obtenus dans quelques secondes (figure 30).
6. Cliquer sur enregistrer et effacer.
7. Et enfin décharger la lame et la jeter dans la poubelle de la paillasse.



**Figure 29 : la mise au point de l'échantillon. Figure 30 : les étapes de mesure par le CASA.**

## **7.Étude statistique :**

### **7.1. Collecte et présentation des données brutes**

Les données brutes de notre étude sont collectées à partir des différentes analyses effectuées à savoir la numération cellulaire (Cellule de Neubauer) ainsi que l'analyse par le système CASA.

Ces données sont saisies manuellement sur une table Excel. Les données brutes sont présentées sous la forme qui permettra leur prise en charge par le logiciel d'analyse statistique « R ».

### **7.2. Analyse statistique des données**

Microsoft Excel est utilisé pour la tabulation ainsi que le graphisme.

Le logiciel R est utilisé pour :

- Effectuer les statistiques descriptives (moyenne, écart type, erreur standard de la moyenne) et le coefficient de variation entre les cinq répétitions de chaque analyse individuelle.
- Tester la distribution normale des séries statistiques.
- La transformation logarithmique des données si la distribution n'est pas normale.
- La comparaison des moyennes entre les variables étudiées par analyse de variance (ANOVA) suivie du test de Dunnett afin d'effectuer la comparaison multiple et définir les différences significatives entre les diverses classes de données.

Le seuil de significativité a été défini à 5% ( $p < 0.05$  ;  $n=50$ ) et les résultats ont été présentés sous forme de Moy $\pm$ SEM.

## **Chapitre III : Résultats et discussion**

## Résultats et discussion

Dans un centre de production de semence bovine (CPS), le contrôle de qualité (CQ) est systématique et s'adresse à plusieurs facteurs dont les caractéristiques spermatiques ayant un impact direct sur la fertilité et la réussite de l'insémination artificielle. Ce contrôle s'effectue à plusieurs niveaux du procès depuis la collecte de l'éjaculat jusqu'à la production de paillettes ou de doses d'insémination.

Parmi ces caractéristiques, la concentration spermatique finale en paillette représente un paramètre clé qui est fortement corrélé à la fertilité *in vivo* (Mohanty *et al.*, 2018). Ce paramètre peut être influencé par des erreurs dans la dilution finale de la semence lors du procès de cryoconservation. Cette étape de dilution finale a été considérée pour cette raison comme étant un point de contrôle critique (CCP : critical control point) non compensable dans le système HACCP développé et implémenté pour la première fois en production de semence bovine dans un CPS au Brésil par Goularte et ses collaborateurs en 2015 (Goularte *et al.*, 2015).

La valeur usuelle du nombre de spermatozoïdes dans une paillette produite oscille entre 10 et 20 millions cellules (Mohanty *et al.*, 2018). Toute chute de ce nombre de spermatozoïdes est associée à une baisse considérable de la fertilité (Vincent *et al.*, 2015 ; Mohanty *et al.*, 2018). Selon les normes minimales d'Assurance Qualité implémentée en production de semence bovine, 20 millions spermatozoïdes par dose d'IA ou paillette fine (0.25mL) est le seuil appliqué dans le contrôle de ce paramètre en dessous duquel toute semence produite doit être éliminée (Goularte, 2018).

Il existe plusieurs moyens d'évaluer la concentration spermatique, à savoir la numération microscopique au moyen d'un hématimètre qui représente la technique conventionnelle (Maes *et al.*, 2010). La cellule de Neubauer de type amélioré représente l'hématimètre recommandé par l'OMS dans son dernier guide de laboratoire d'analyse spermatique (OMS, 2010). Cependant, cette technique semble être très contraignante en matière de temps si elle est appliquée selon les dernières recommandations de l'OMS notamment avec le respect du temps nécessaire aux spermatozoïdes de se décanter au fond de la lame, le comptage manuel dupliqué sur les deux grilles et la confrontation des résultats aux tableaux de référence pour déterminer si la différence est acceptable au risque de refaire toute l'opération dans le cas contraire. Dans notre laboratoire, nous avons estimé le temps moyen d'une numération à 15min (données non publiées).

De plus, avec cette méthode conventionnelle, la subjectivité de la numération visuelle rend la comparaison des résultats difficile entre différents opérateurs et laboratoires. (Maes *et al.*, 2010)



Toutes ces contraintes rendent la technique classique incompatible avec le contexte du contrôle de qualité au sein d'un centre de production intensive de semence où l'on peut avoir à contrôler quotidiennement un nombre important de paillettes (60-90) à raison de trois par éjaculat collecté (20-30/jour). Il est donc indispensable de trouver une technique alternative qui soit aussi précise que la technique conventionnelle mais plus rapide et mieux adaptée au contexte du CQ.

**La spectrophotométrie**, utilisable en routine sur sperme frais pour la préparation de doses d'insémination dans les CPS, est une technique rapide et automatisée qui mesure la densité optique d'un échantillon de sperme dilué et en détermine la concentration. Le spectrophotomètre mesure l'absorbance d'une solution à une longueur d'onde donnée. Dans la pratique, l'appareil réalise une mesure de l'intensité de la lumière après son passage au travers d'une cuve contenant la solution à étudier. L'intensité de la lumière monochromatique émise ( $I_0$ ) est connue. À partir de la mesure de l'intensité de la lumière transmise ( $I$ ), l'appareil donne l'absorbance ( $A$ ) selon la formule suivante :  $A = \log (I_0/I)$ .

Cependant, nous ne nous sommes pas intéressés dans notre étude à cette technique, car elle est également incompatible avec l'analyse de la semence congelée dans un milieu (dilueur) contenant généralement du lait ou du jaune d'œuf comme constituants de base pour leur propriété cryoprotectrice des spermatozoïdes. En effet, la présence de ces produits dans le milieu de congélation rend la semence opalescente et trouble ce qui modifie sa densité optique et interfère ainsi avec le principe de cette technique induisant une surestimation de la valeur de concentration (Allimant 2010 ; Tahloult, Haffad et Slamani, 2019). Par contre, la spectrophotométrie serait éventuellement utilisable sur semence congelée dans un milieu parfaitement transparent ne contenant ni lait ni jaune d'œuf tel que la nouvelle génération des dilueurs à base de liposomes utilisés avec succès dans la conservation de la semence équine (Pillet et al., 2012), humaine (Mutalik et al., 2014), bovine (Le Guillou et al. 2015 ; Kumar et al., 2015) et canine (Belala et al., 2016).

**Le système CASA** (pour computer aided sperm analysis) comprend un microscope à contraste de phase doté d'une platine chauffante et d'une caméra à très haute performance. A partir d'un volume précis (3 $\mu$ l) de suspension chargée dans une chambre d'analyse (20 $\mu$ m), cette dernière permet de capturer individuellement plusieurs centaines de cellules par champs d'analyse à raison de 60 captures par seconde (Vitesse de capture exprimée en Hz ou en fps « frame per seconde »). Un logiciel d'analyse d'image (Les algorithmes du système) permettra de reconstituer les trajectoires individuelles des spermatozoïdes et d'effectuer une analyse informatique pour générer plusieurs caractéristiques cinétiques reflétant la qualité du mouvement de ces spermatozoïdes. Il s'agit donc d'une technique d'analyse d'image automatisée qui permet

d'évaluer la mobilité des spermatozoïdes avec une grande objectivité comparée à l'œil humain (la microscopie optique) qui demeure très subjectif. Ce système mesure aussi la concentration spermatique au même temps que la mobilité, et le temps moyen par analyse est de quelques secondes, ce qui représente un grand intérêt dans le contexte d'un CQ au sein des centres de production intensive de semence.

Cependant, si ce système s'avère être fiable pour l'analyse de la mobilité spermatique, il ne semble pas être autant fiable dans la mesure de la concentration. En effet, les valeurs que nous avons obtenues précédemment dans notre laboratoire étaient souvent sous-estimées ou surestimées comparées à la technique conventionnelle « i.e. Numération par la cellule améliorée de Neubauer » (Fdailainne, 2017, Tahloult, Haffad et Slamani, 2019).

Ce constat a été rapportée par plusieurs auteurs dans la littérature. En effet, le système Hamilton-Thorn (HTR Ceros 12.1) a été utilisé pour l'analyse de la semence canine et les mesures de concentration de sperme étaient systématiquement plus faibles (en moyenne 14,8%) par rapport aux valeurs obtenues par la chambre Bürker. En semence porcine également, les concentrations de spermatozoïdes avec le HTR Ceros 12.1 étaient plus faibles (-32%) par rapport aux valeurs obtenues avec la chambre Bürker. Par contraste à cela, d'autres auteurs ont rapporté une surestimation de la concentration des spermatozoïdes mesurée par le système CASA (Maes et al., 2010).

Ces limites du système CASA dans l'évaluation de la concentration en spermatozoïdes pourraient être associées à plusieurs facteurs d'influence à savoir :

- ✓ L'erreur humaine de manipulation lors du procès de préparation de la semence avant analyse (les étapes et les moyens de dilution et de pipetage).
- ✓ Les granules corpusculaires ayant les mêmes dimensions d'une tête de spermatozoïde peuvent être capturés comme étant une cellule spermatique par le système CASA ce qui tend à surestimer la concentration.
- ✓ La présence de spermatozoïdes agglutinés « un phénomène fréquemment observé dans l'examen microscopique du sperme » qui sont soit numérisés sous la forme d'une seule image, soit rejetés de l'analyse « étant trop grands pour une tête de spermatozoïdes selon la plage de tailles de pixels dans les paramètres du système ». Ceci entraînera par conséquent une sous-estimation de la concentration des spermatozoïdes (Mortimer et al., 1988 ; Chan et al., 1989 ; Verstegen et al., 2002).
- ✓ Le mouvement des spermatozoïdes (étant donné que le système mesure la concentration au même temps que la mobilité) notamment dans les champs microscopiques trop concentrés.

- ✓ Le type de chambre d'analyse (Lame Leja vs. Chambre Makler) et sa profondeur (exprimée en  $\mu\text{m}$ ) impliquant les éventuelles erreurs de mesure du volume et d'homogénéité de la suspension spermatique (échantillon) chargée dans la chambre.

Dans notre présente étude, nous voulions étudier les deux facteurs qui nous paraissent les plus impactants à savoir :

- ✓ Chambres d'analyse les plus largement utilisées avec l'analyseur CASA (i.e. la lame Leja® et la chambre de Makler®),
- ✓ Mobilité spermatique (spermatozoïdes mobiles versus immobilisés) et son effet sur la mesure de la concentration.

L'influence de la chambre d'analyse et notamment sa profondeur ont été précédemment impliquées dans les erreurs de mesure de la concentration par le système CASA ce qui justifie l'étude de ce facteur (Douglas-Hamilton et al., 2005b). La profondeur de la chambre est un facteur parmi d'autres qui influe sur la mesure de la concentration spermatique par interactions avec les parois de la chambre d'analyse. En 2005, Douglas-Hamilton et ses collaborateurs ont été les premiers à montrer que la distribution des spermatozoïdes en suspension est régulée par un phénomène de la dynamique des fluides appelé l'effet de **Segre-Silberberg**. Cet effet produit une force de levage transversale sur les particules en suspension, qui sont entraînées vers deux plans stables situés à une courte distance calculable des parois. Par conséquent, une concentration de cellules relativement plus faible est comptée au centre du champ microscopique. Cela sous-estime la concentration de spermatozoïdes déterminée par le système CASA. A contrario, ce phénomène de Segré-Silberberg ne s'observe pas dans l'hématimètre de Neubauer (numération manuelle) à cause de sa grande profondeur ( $100\mu\text{m}$ ). Son incidence est donc inversement proportionnelle à la profondeur de la chambre (Douglas-Hamilton et al., 2005 ; Dorado et al., 2011).

Notre hypothèse était que la lame Leja® soit plus adaptée que la chambre Makler®. En effet, bien que la question relative à la chambre d'analyse reste bien controversée dans la littérature, la plupart des auteurs rapporte que la lame Leja® donne plus de précision comparée à la chambre de Makler® (Davis and Katz 1993 ; Verstegen et al. 2002 ; Gączarzewicz, 2015 ; Shubert et al., 2019).

Ces résultats s'expliqueraient par le fait que la lame Leja est une chambre à usage unique et à  $20\mu\text{m}$  de profondeur qui se charge passivement (d'un volume fixe de  $3\mu\text{m}$  d'échantillon) par capillarité au contact de la semence ce qui n'induit ni biais de mesure manuelle du volume ni d'homogénéité lors de la dispersion des cellules dans la suspension spermatique. En effet, la

lame Leja® actuellement commercialisée est améliorée et conçue spécialement pour corriger l'effet Segre-Silberberg décrit ci-dessus. Par contre, la chambre Makler® est une lame à 10µm de profondeur (moins importante que la lame Leja®), réutilisable, constituée de deux pièces (lame + couvercle) chargée par pipetage d'un volume de semence qui sera écrasé par le dépôt du couvercle. Ceci semble être associé à un biais relatif à la mesure manuelle du volume d'échantillon et à une répartition hétérogène des cellules dans la suspension spermatique. Ceci se traduirait par des mesures erronées (Schubert, Badiou, Force, 2019).

En contraste avec ces données rapportées par la majorité des auteurs, Gloria et ses collaborateurs ont comparé plusieurs chambres d'analyse dans l'évaluation des paramètres cinétiques des spermatozoïdes bovins par un système Hamilton Thorne-IVOS 12.3 et ont rapporté des résultats en faveur de la chambre Makler® avec une distribution homogène des spermatozoïdes contre la lame Leja® ayant montré une distribution non homogène des cellules spermatiques avec un nombre plus élevé en côte (angle postérieur) de lame par rapport au champs central (Gloria et al., 2013). Ces auteurs n'ont pas étudié le paramètre de concentration, ils se sont intéressés uniquement aux paramètres cinétiques et pour expliquer leurs résultats, ils ont avancé comme alternative à l'effet Segré-Silberberg, l'hypothèse d'un effet délétère sur les spermatozoïdes par un composant de ces lames (à lamelle préfixée et à remplissage par capillarité) tel que la colle utilisée pour fixer la lamelle ou la peinture pour la sérigraphie. Cette hypothèse mérite des études spécifiques pour la confirmer ou l'infirmer.

Trois ans plus tard, Ibanescu et ses collaborateur (Ibanescu et al., 2016) ont comparé trois chambres d'analyse de même profondeur de 20µm (Leja® vs. MofA® vs. Minitube®) ainsi d'une technique conventionnelle (cellule de Thoma) dans l'évaluation de la concentration des spermatozoïdes bovins congelés-décongelés par le système Sperm-Vision version 3.7 (Minitube of America—MOFA®, Verona, WI, USA). La lame MofA était la plus corrélée à la technique conventionnelle utilisée (Thoma). Ces auteurs ont confirmé l'influence de la chambre sur la mesure de la concentration en faveur d'une sous-estimation, et ce indépendamment de sa profondeur (identique pour les trois lames comparées). Ceci serait due à l'effet Segré-Silberberg exacerbé par un remplissage de la chambre qui respecte moins la capillarité que dans la cellule MofA®. En effet, cette dernière se distingue des deux autres par un système de remplissage (par capillarité) qui se fait passivement à partir d'une goutte déposée au centre de la lame. Par ailleurs, ces auteurs ont répété l'analyse trois fois à trois moments différents : immédiatement, 6min et 12min après remplissage de la lame et ils ont observé que la sous-estimation de la concentration augmente au fur et à mesure du temps après emplissage de la lame. Pour expliquer ce résultat, ils ont avancé l'hypothèse d'une action toxique « temps-dépendante » exercée par des éventuels produits chimiques utilisés dans la fabrication de ces chambres. Cette toxicité présente sur les

bords (côtes) de la lame altère la mobilité des spermatozoïdes à proximité de ces bords en exacerbant la distribution non homogène des cellules spermatique au fur et à mesure du temps.

Concernant le deuxième facteur d'influence étudié « le mouvement des spermatozoïdes », son influence sur la mesure de la concentration par le système CASA pourrait s'expliquer par le fait que le mouvement des spermatozoïdes notamment dans les champs microscopiques trop concentrés, peut provoquer un **phénomène de collision** (entre les spermatozoïdes morts et vivants). Cette collision, provoque une **diffraction des trajectoires** des cellules spermatiques et un **comptage dupliqué** par succession de captures, ce qui tend à surestimer la concentration (Douglas-Hamilton et al., 2005 ; Gączarzewicz, 2015 ; Schubert et al., 2019).

Notre hypothèse est que l'immobilisation des spermatozoïdes avant de mesurer la concentration par le système CASA pourrait améliorer les résultats tel que rapporté par plusieurs auteurs (Brito et al., 2016 ; Schubert et al., 2019). En effet, cette approche a permis dans des études réalisées précédemment dans notre laboratoire en analysant la semence canine par les systèmes SCA (Fdailainne, 2017) et Hamilton Thorn IVOS II (Tahloult, Haffad et Slamani, 2019) de corriger cet effet collision-diffraction en rapprochant considérablement les résultats des valeurs obtenues par la technique conventionnelle (Numération par la Cellule de Neubauer).

En conclusion, le système Hamilton Thorn IVOS II optimisé par l'utilisation d'une chambre d'analyse adaptée (Leja® 20µm de profondeur) et par l'immobilisation des spermatozoïdes avant analyse (dilution dans une solution saline hypertonique) représenterait une bonne alternative à la méthode conventionnelle (Numération par la Cellule de Neubauer). Cette technique présente l'avantage d'être objective, automatisée, très rapide et de ce fait parfaitement adaptée au contexte du CQ dans les CPS à l'instar du CNIAAG en Algérie.

Enfin, notre présent travail s'est limité à l'étude de deux facteurs d'influence à savoir la chambre d'analyse et le phénomène de collision dû au mouvement des spermatozoïdes. Cependant, il serait intéressant d'étudier à l'avenir d'autres facteurs d'influence comme la concentration de l'échantillon analysé, la vitesse de capture des spermatozoïdes et l'adaptation du paramétrage technique du système à l'état (frais ou congelé) des spermatozoïdes.



## **Conclusion**

## Conclusion

A l'issue de notre travail, nous concluons ce qui suit :

Le système CASA (Hamilton Thorn – IVOS II) représenterait une bonne alternative à la technique de numération conventionnelle (Cellule Neubauer) pour évaluer la concentration des spermatozoïdes bovins congelés en paillettes fines.

La mesure de la concentration des spermatozoïdes par le système CASA (Hamilton Thorn – IVOS II) pourrait être optimisée par :

- ✓ L'utilisation d'une chambre d'analyse adaptée (La lame Leja® d'une profondeur de 20µm)
- ✓ L'immobilisation des cellules spermatique avant analyse (Dilution dans une solution saline hypertonique « 4% ») en séparant ainsi entre l'analyse de la mobilité et la mesure de la concentration.

Cette technique d'analyse présente l'avantage d'être objective, automatisée, très rapide et de ce fait parfaitement adaptée au contexte du contrôle de qualité dans les centres de production de semence à l'instar du CNIAAG en Algérie.



## **Recommandations**



## Recommandations

A la lumière de notre travail, nous voudrions recommander d'étudier à l'avenir les effets d'autres facteurs pouvant influencer sur les résultats d'analyse par le système Hamilton Thorn-IVOS II en comparant :

- ✓ La lame Leja® à 4 chambres vs. Lame Leja® à 8 chambres.
- ✓ La concentration en spermatozoïdes de l'échantillon analysé (notamment les faibles concentrations comme le cas des paillettes fines après dilution).
- ✓ Plusieurs vitesses de capture du système : 60 vs. 100 vs. 150 vs. 200 vs. 250 (Hz / fps).
- ✓ La semence fraîche vs. Semence congelée (Adaptation du paramétrage technique du système).
- ✓ Les algorithmes des différents systèmes CASA (HT-IVOS II vs. SCA-Evolution).

## **Références bibliographiques**

- **Allimant M. (2010).** Thèse de doctorat vétérinaire, Université Claude- Bernard, Lyon, 138p. Amann RP, Waberski D. Computer-assisted sperm analysis (CASA): Capabilities and potential developments. *Theriogenology*. 2014 Jan;81(1):5–17. e1–3.
- Amann RP. (1983). Endocrine changes associated with onset of spermatogenesis in Holstein bulls. *J Dairy Sci.*; 66(12):2606- 22.
- Ball PJH, Peters AR, Peters AR. (2004). *Reproduction in cattle*. 3rd edition. Oxford, UK ; Ames, Iowa : Blackwell Pub; 242 p.
- Barone, R. (2001). *Anatomie comparée des mammifères domestiques*. Tome 4. Splanchnologie II. Appareil uro-génital. Foetus et ses annexes. Péritoine et topographie abdominale. 3ème édition. Paris ; France. 896 p.
- **Barth, A.D., Arteaga, A.A., Brito, L.F.C. (2004).** Use of internal artificial vaginas for breeding soundness evaluation in range bulls: an alternative for electroejaculation allowing observation of sex drive and mating ability – *Animal Reproduction Science*, 84,315-325.
- **Belala R., Delay J., Amirat L., Ropers M-H., Le Guillou J., Anton M., Schmitt E., Thorin C., Michaud S., Kaidi R., Bencharif D. (2016).** *Animal Reproduction Science*. journal homepage: [www.elsevier.com/locate/anireprosci](http://www.elsevier.com/locate/anireprosci). 168: 100-109.
- **Blockey, M.B. (1980).** Using the serving capacity test to get the most out of beef bulls – *Perth. Proc. Aust. Soc. Anim. Prod*, 13, 50-53.
- **Bonnes G et Batellier F. (2005).** *Reproduction des animaux d'élevage*. 2ème édition. Dijon : Educagri Editions; 407 p.
- **Bordas C. (1988).** L'examen microscopique du sperme et l'interprétation de ses résultats dans le contexte de la monte naturelle en zone charolaise. *Recl Médecine Vét.* 164(6/7).
- **Bouyer B. (2006).** Bilan et analyse de l'utilisation de L'insémination artificielle dans les programmes D'amélioration génétique des races laitières en Afrique soudano-sahélienne. Thèse de doctorat vétérinaire. Université claud-bernard-lyon I (médecine - pharmacie).
- **Brazil C et al. (2004).** Quality control of laboratory methods for semen evaluation in a multicenter research study. *Journal of Andrology*, 25:645-656.

- **Brito LFC, Silva AEDF, Rodrigues LH, Vieira FV, Deragon L a. G, Kastelic JP. (2002).** Effect of age and genetic group on characteristics of the scrotum, testes and testicular vascular cones, and on sperm production and semen quality in AI bulls in Brazil. *Theriogenology*. 58(6):1175-86.
- **Brito LFC, Althouse GC, Aurich C, Chenoweth PJ, Eilts BE, Love CC, Luvoni GC, Mitchell JR, Peter AT, Pugh DG, Waberski D. (2016).** Andrology laboratory review: evaluation of sperm concentration, *Theriogenology*, doi: 10.1016/j.theriogenology.2016.01.002.
- **Chan SYW., Wang BL., Song T., Lo A., Tsoi WL., Leung J. (1989).** Computer assisted image analysis of sperm concentration in human semen before and after swim up preparation: comparison with assessment of hemocytometer. *International Journal of Andrology* 12, 339-345.
- **Chenoweth K. Pudar S. Oxgaard J. Adri C. T. van Duin, and, William A. Goddard, (2007).** Mechanism of Selective Oxidation of Propene to Acrolein on Bismuth Molybdates from Quantum Mechanical Calculations. *The Journal of Physical Chemistry C III* (44) , 16405-16415. <https://doi.org/10.1021/jp074452a>
- **Chu DS, Shakes DC. (2013).** Spermatogenesis. *Adv Exp Med Biol*. 757:171-203.
- Davis RO., Katz DF. (1993). Operational standards for CASA instruments. *Journal of Andrology* 14, 385-394. Douglas-Hamilton D., Smith N., Kuster C., Vermeiden J., Althouse G. (2005a). Particle distribution in low-volume capillary-loaded chambers. *Journal of Andrology* 26, 107-114.
- **Dorado J., Rijsselaere T., Muñoz-Serrano A., and Hidalgo M. (2011).** Influence of sampling factors on canine sperm motility parameters measured by the Sperm Class Analyzer. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, Copyright © 2011 Informa Healthcare USA. 57: 318–325.
- **Douglas-Hamilton DH, Smith NG, Kuster CE, Vermeiden JPW, Althouse GC. (2005a).** Capillary-Loaded Particle Fluid Dynamics: Effect on Estimation of Sperm Concentration. *JAndrol*. Jan-Feb;26(1):115–22.
- **Douglas-Hamilton D., Smith N, Kuster C., Vermeiden J., Althouse G. (2005b).** Capillary loaded particle fluid dynamics: effect on estimation of sperm concentration. *Journal of Andrology* 26, 115-122.
- **Drion, J.P., Beckers, J.F., Derivaux, J. et Ectors, F. (1993).** *Physiologie de la reproduction*. Ed. Gallimard, 152 p.

- **Dumont P. (1997).** Appréciation de la fonction sexuelle du taureau reproducteur. *Point Vét.* 28(185):19- 30.
- **Educagri, (2005).** Reproduction des animaux d'élevage. Educagri Edition, Dijon, France 407 p.
- **Fernández-Gago R., Dominguez JC, Martmez-Pastor F. (2013).** Séminal plasma applied postthawing affects boar sperm physiology: A flow cytometry study. *Theriogenology*, 1 -11.
- **Fontbonne A. et Dumon Ch. (1992).** In : *Les indispensables de l'animal de compagnie. Reproduction du chien et du chat.* P.M.C.A.C. Editions.
- **Frandsen RD, Wilke WL, Fails AD. (2009).** Anatomy and Physiology of Farm Animals. 7th Edition. Seventh Edition. Ames: Wiley-Blackwell; 512 p
- **Fuerst-Waltl B, Schwarzenbacher H, Perner C, Sölkner J. (2006).** Effects of age and environmental factors on semen production and semen quality of Austrian Simmental bulls. *Anim Reprod Sci.* 95(1-2):27-37.
- **Gerard, O. et Khirredine, B. (2002).** Production de semence bovine - Didacticiel de Maîtrise de la reproduction des bovins. 2002, 73 p.
- **Gloria A., Carluccio, A Contri, A. Wegher, L. Valorz C. and Robbe, D. (2013).** The effect of the chamber on kinetic results in cryopreserved bull spermatozoa. *Andrology*, 1-7. doi: 10.1111/j.2047-2927.2013. 00121.x
- **Goldberg E, Zirkin BR. Spermatogenesis (2018).** Overview. In: Encyclopedia of Reproduction. second edition. San Diego: Elsevier; p. 13-8.
- **Goularte K.L., Ferreira, C.E.R. Madeira, E.M. ; Duval, EH.; Vieira, AD. Mondadori, RG.; Jr, T.L. (2018).** The implementation of a HACCP system improved the efficiency of a bull semen collection and processing center. *Anim. Reprod.*, v.15, n.2, p.108-113.
- **Goularte K.L., Madeira, E.M. ; Ferreira, C.E.R. ; Duval, EH.; Vieira, AD. Mondadori, RG.; Jr, T.L. (2015).** Hazard Analysis and Critical Control Points System for a Bull Semen Production Centre. *Reprod Dom Anim* 50, 972 - 979.
- **Hafez B, Hafez ESE. (2000).** Reproduction in farm animals. 7th edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 509 p.
- **Hanzen Ch. (2010).** Rappels anatomophysiologiques relatifs à la reproduction du taureau. ORBI. Université de Liège, 8 P.

- **Hess R.A., de Franca LR. (2009).** Spermatogenesis and Cycle of the Seminiferous Epithelium. Dans: Cheng CY, rédacteur. Molecular Mechanisms in Spermatogenesis. New York, NY: Springer New York; p. 1- 15.
- **Heymon Y., Vignon X. (2005).** Reproduction des animaux d'élevage. Educagri.
- **Hopkins SM., Armstrong DL., Hummel SKC., Junior S (1988)** Successful Cryopreservation of Gaur (*Bos gaurus*) epididymal spermatozoa. Journal of Zoo Animal Medicine., P : 19, 195-201.
- **Hopper RM. (2015).** Bovine reproduction. Ames, Iowa : John Wiley & Sons Inc. 800 p.
- **Ibanescu et al., Leiding, C. Ciorneia, SG., Rosca, P. Sfartz I. Drugociu D. (2016)** Differences in CASA output according to the chamber type when analyzing frozen-thawed bull sperm. Animal Reproduction Science 166 : 72–79
- **Iguer-Ouada M, Verstegen JP, 2001.**Evaluation of the “Hamilton Thorn computer-based automated system” for dog semen analysis. Theriogenology 55 (3), 733-749
- **Kastelic JP, Thundathil JC. (2008).** Breeding soundness evaluation and semen analysis for predicting bull fertility. Reprod Domest Anim Zuchthyg. 43 Suppl 2:368- 73.
- **Konfe H. (2014).** Etude spermiologique des bovins de races locales de l’Afrique de l’Ouest : cas du Borgou , du taurin Lagunaire , du taurin N’Dama et du Zébu Peulh., Université polytechnique de Bobo-Dioulasso:87
- **Kumar, P., Sainia, M., Kumar, D., Balhara, A.K., Yadav, S.P., Singh, P., Yadav, P.S. (2015).** Liposome-based semen extender is suitable alternative to egg yolk-based extender for cryopreservation of buffalo (*Bubalus bubalis*) semen. Anim. Reprod. Sci. 159, 38–45.
- **Laghrour W. (2012).** Comparaison de deux *méthodes* de traitement de Maitrise des cycles associant la progestérone Œstrogènes et la prostaglandine f2alpha chez la Vache laitière. *Thèse de magister. Université el-hadj lakhdar Batna*
- **L’Hernault SW. Spermatoocytes (2001).** Dans: Encyclopedia of Genetics. Berkeley : Elsevier; p 1872-3.
- **Le Guillou, J., Ropers, M.H., Gaillard, C., David-Briand, E., van Leeuwen-Ibarrolab, J., Desherces, S., Schmitt, E., Bencharif, D., Amirat-Briand, L., Anton, M., Tainturier, D. (2015).** Sequestration of bovine seminal plasma proteins by

different assemblies of phosphatidylcholine: a new technical approach. *Colloids Surf. B: Biointerfaces*,

- **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 .42,42-47. Quebec, Canada. 2 The Semex Alliance, Guelph, Ontario, Canada. *Anim Reprod*, v.9, n.3, p.153-165.
- **Manciaux L, Chambon G. (2011).** Santé reproductive et conduite du taureau en monte naturelle. *Nouv Prat Vét.* 4(18):23- 9.
- **Menon AG, Barkema HW, Wilde R, Kastelic JP, Thundathil JC. (2011).** Associations between sperm abnormalities, breed, age, and scrotal circumference in beef bulls. *Can J Vet Res Rev Can Rech Veterinaire.* ;75(4):241- 7.
- **Microptics (2018).** Makler. [www.micropticsl.com/produits](http://www.micropticsl.com/produits) (consulté le 08/09/2020).
- **Mortimer D., Goel N., Shu MA. (1988).** Evaluation of the CellSoft automated semen analysis system in a routine laboratory setting. *Fertility and Sterility* 50, 960-968.
- **Mortimer D, Serres C, Mortimer ST, Jouannet P. (1988).** Influence of image sampling frequency on the perceived movement characteristics of progressively motile human spermatozoa. *Gamete Res.* 1988. Jul;20(3):313–27.
- **Mortimer ST. (2000).** CASA – Practical Aspects. *J Androl.* 2000 Jul-Aug;21(4):515–24.
- **Mutalik, S., Salian, S.R., Avadhani, K., Menon, J., Joshi, H., Hegde, A.R., Kumar, P., Kalthur, G., Kumar, A.G. (2014).** Liposome encapsulated soy lecithin and cholesterol can efficiently replace chicken egg yolk in human semen cryopreservation medium. *Syst. Biol. Reprod. Med.* 60 (3), 183–188.
- **O’Hara L, Smith LB. (2015).** Androgen receptor roles in spermatogenesis and infertility. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 29(4):595- 605
- **O’Shaughnessy PJ. (2014).** Hormonal control of germ cell development and spermatogenesis. *Semin Cell Dev Biol.* 29:55- 65.
- **Parez, M. et Duplan, J.M. (1987).** L’insémination artificielle bovine, ROGER MARION Edition. Reproduction et amélioration génétique, Paris, France 256 p.
- **Parkinson TJ. (2004).** Evaluation of fertility and infertility in natural service bulls. *Vet J Lond.* 68(3):215- 29.

- **Pietremont JL. (1995).** Testage du taureau. Appréciation de son aptitude aux fonctions de reproduction, appréciation de la qualité de son éjaculat. Bull GTV, (2):33-7.
- **Pillet, E., Labbe, C., Batellier, F., Duchamps, G., Beaumal, V., Anton, M., Desherces, S., Schmitt, E., Magistrini, M. (2012).** Liposomes as an alternative to egg yolk in stallion freezing extender. Theriogenology 77 (2), 268–279.
- **Quang Nhuan T. (2003).** À propos de l'exploration de l'axe hypothalamo-hypophysio-gonadique. Immuno-analyse & Biologie spécialisée, 18: 35-40.
- **Quint, D. (2004).** Rationalisation de la conduite thérapeutique lors d'affection du tractus génital du taureau : Etude de la diffusion de molécules antibiotiques dans le sperme - Th. : Med.vet. Toulouse : TOU 3 - 4013.
- **Schlatt S, Ehmcke J. (2014).** Regulation of spermatogenesis: An evolutionary biologist's perspective. Semin Cell Dev Biol., 29:2-16.
- **Schubert B., Badiou M., Force A. (2019).** Computer aided sperm analysis, the new key player in routine sperm assessment. Andrologia, 2019;00:e13417. <https://doi.org/10.1111/and.13417>.
- **Staub C, Johnson L. (2018).** Review: Spermatogenesis in the bull. Anim Int J Anim Biosci., 12(1):27-35.
- **Utt MD. (2016).** Prediction of bull fertility. Anim Reprod Sci. 169:37-44.
- **Tahloult, Haffad et Slamani (2019).** Etude comparative entre trois méthodes d'évaluation de la concentration spermatique chez le chien. Projet de fin d'études en vue de l'obtention du Diplôme de Docteur Vétérinaire. Institut des Sciences Vétérinaires. Université Saad Dahlab-Blida 1. 53.
- **Thibault C. (2001).** La reproduction chez les mammifères et l'homme. Ellipses.
- **T. K. Mohanty. Shabir Ahmad Lone. Arumugam Kumaresan. Mukesh Bhakat. (2018).** Sperm dosage and site of insemination in relation to fertility in bovines. DOI: 10.4103/2305-0500.220977.
- **Tomlinson M, Turner J, Powell G, Sakkas D., (2001).** One-step disposable chambers for sperm concentration and motility assessment: how do they compare with the World Health Organization's recommended methods? Hum Reprod 16: 121-124
- **Traore P. (1996).** Les méthodes d'évaluation du sperme du taureau destiné à l'insemination artificielle. These: Méd. Vét. : Rabat (IAV Hassan II)
- **Utt A, Quirin T, Saul S, Hellström K, Ahola T, Merits A (2016)** Versatile *Trans*-Replication Systems for Chikungunya Virus Allow Functional Analysis and Tagging



of Every Replicase Protein. PLoS ONE 11(3): e0151616.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0151616>.

- **Verstegen J, Iguer-Ouada M, Onclin K., (2002).** Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Ther-iogenology*. 57:149–79.
- **Vincent P, Underwood S. L., Dolbec, C. Bouchard N. Kroetsch T. and Blondin P., (2015).** Bovine Semen Quality Control in Artificial Insemination Centers. *Bovine Reproduction*, First Edition. Edited by Richard M. Hopper.
- **World Health Organization, (2010).** WHO laboratory manual for the Examination and processing of human semen “FIFTH EDITION”. 978 92 4 154778 9, NLM classification : QY 190, 271p.
- **Zsuppan Z, Lherm M, Ingrand S., (2015).** Performances de reproduction des vaches allaitantes charolaises. Analyse de leurs diversités en lien avec les pratiques des éleveurs. *Viandes et produits carnés*;1- 9.