



Institut des Sciences
Vétérinaires- Blida

Université Saad
Dahlab-Blida 1-



Projet de fin d'études en vue de l'obtention du
Diplôme de Docteur Vétérinaire

**Etude comparative entre trois méthodes d'évaluation de la
concentration spermatique chez le chien.**

Présenté par :

- **Tahlout Mouloud.**
- **Haffad Yamina.**
- **Slamani Liza.**

Devant le jury :

| | | | |
|-----------------------|-----------|-----|---------------|
| Président(e) : | YAHIMI A. | MCB | Univ. BLIDA-1 |
| Examineur : | ADEL D. | MCB | Univ. BLIDA-1 |
| Promoteur : | BELALA R. | MCB | Univ. BLIDA-1 |

Année : 2018-2019



Institut des Sciences
Vétérinaires- Blida

Université Saad
Dahlab-Blida 1-



Projet de fin d'études en vue de l'obtention du
Diplôme de Docteur Vétérinaire

**Etude comparative entre trois méthodes d'évaluation de la
concentration spermatique chez le chien.**

Présenté par :

- **Tahloult Mouloud.**
- **Slamani Liza.**
- **Haffad Yamina.**

Devant le jury :

| | | | |
|-----------------------|-----------|-----|---------------|
| Président(e) : | YAHIMI A. | MCB | Univ. BLIDA-1 |
| Examineur : | ADEL D. | MCB | Univ. BLIDA-1 |
| Promoteur : | BELALA R. | MCB | Univ. BLIDA-1 |

Année : 2018-2019

Remerciements

Nous louons Dieu le tout puissant pour nous avoir prêté force et patience pour l'aboutissement de ce modeste travail.

A Monsieur le docteur Belala R

Qui fut à l'origine de ce travail et qui nous a permis de bénéficier de son encadrement. Les conseils qu'il nous a prodigué, la patience, la disponibilité, la confiance qu'il nous a témoigné ont été déterminantes dans la réalisation de notre travail.
Sincères remerciements et Profonde gratitude.

A Monsieur le docteur YAHIMI A

Qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de notre jury de mémoire,
Hommages respectueux.

A Monsieur le docteur ADEL D

Qui nous a fait l'honneur de participer à notre jury de mémoire,
Pour son apport critique sur ce travail,
Sincères remerciements.

A toute l'équipe qui a contribué à la réalisation de ce travail

Nous exprimons aussi nos meilleurs sentiments de gratitude aux ingénieurs de la banque de semence Mr SACI TAYAB et Mr GHEZAL ABD -ELGHANI pour leur bonne humeur, leur accueil chaleureux et d'avoir consacré leurs temps à nous aider dans nos travaux pratiques.
M^{lle} Myra pour son aide précieuse au cours de ce travail et sa gentillesse.

Dédicace

Je dédie ce modeste travail :

A mon Cher père, qui a toujours cru en moi et a mis à ma disposition de tous les moyens nécessaires pour que je réussisse dans mes études.

*A ma chère mère, que je ne cesse de remercier pour tous ce qu'elle m'a donné.
Que le Bon Dieu la récompense pour tous ses bienfaits.*

A mes frères Yidhir, Ahmed et Salem et à mes sœurs Salma et Fayza.

A tous mes amis qui m'ont aidé de près ou d loin.

A mon trinôme Slamani Liza et Tahloult Mouloud qui s'y donné à fond.

HAFFAD YAMINA.

Dédicace

Je remercie le bon dieu de m'a voir donné le courage pour réaliser ce travail et la patience pour aller jusqu'au bout du parcours de mes études.

Je dédie du plus profond de mon cœur ce manuscrit:

A mon cher père : Pour avoir toujours cru en moi et en mes capacités, pour ton soutien sans faille durant ces longues années d'études. Pour être toi aussi un modèle de force, d'ambition et de patience sans faille.

A ma chère mère : Pour m'avoir soutenue depuis toujours. Pour n'avoir jamais douté de moi et de mes capacités. Pour être toujours présente à mes côtés.

Pour votre soutien inconditionnel et votre bienveillance, Toute ma reconnaissance et tout mon amour. Que le bon dieu vous accorde une longue vie.

A mes frères : Amine et Samy.

A mes sœurs : Lyliia et Ania.

A notre enfance partagée, Je vous souhaite un brillant parcours dans la vie.

A toute ma famille.

A tous mes chères amies.

A mon trinôme : Tahloult mouloud et Haffad Yamina.

A mes professeurs.

Et à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin pour que ce projet soit possible, je vous dis merci

SLAMANI LIZA.

Dédicace

Je dédie ce fruit de fin de cycle en premier lieu à mes chers parents qui ont sacrifié pour mon bonheur, Et que dieu vous accueille dans son vaste paradis

Je le dédie également à:

- *Mes frères : Samir, Houcine, Tarik et Azedine.*
- *Mes sœurs : Akila et Farida.*
- *Ma famille.*
- *Mes amis : Lotfi, Nassim, Méhdi et chems-Dine.*
- *Mes amis d'enfances.*
- *Mon trinôme : Slamani Liza et Hassad Fatima.*

TAHLOULT MOULOU.D.

Résumé

Le présent travail consiste en la comparaison entre trois méthodes d'évaluation de la concentration spermatique chez le chien, en milieux transparent et opaque.

Ces techniques sont la numération hématimétrique au moyen d'une cellule de Neubauer, la photo-spectrométrie par le biais de deux photomètres du commerce calibrés pour le sperme canin (Accuread[®], SDM1[®]) et finalement le comptage par un analyseur CASA (Hamilton Thorne, IVOSII).

Huit éjaculats exploitables ont été récoltés, puis la fraction spermatique de chaque prélèvement a été répartie en deux aliquotes, un laissé à l'état frais et l'autre mélangé à un opaque trouble à base de jaune d'œuf.

Chacun des deux aliquotes a été réparti en cinq fractions évaluées respectivement par la cellule de Neubauer, l'Accuread, le SDM1, le CASA avec spermatozoïdes mobiles et finalement le CASA après immobilisation des cellules spermatiques.

Les résultats suggèrent que les différentes techniques évaluées sont comparables à la technique de référence à l'exception de l'Accuread dans le cas du sperme dilué dans un milieu à base de jaune d'œuf.

La comparaison des différentes techniques d'évaluation entre l'état frais et le milieu opaque suggéré également que toutes les méthodes étudiées sont aussi bien fiables dans les deux situations excepté l'Accuread[®].

«Summary »

The present work consists in the comparison between three methods of evaluation of the spermatic concentration in the dog, in transparent and opaque mediums.

These techniques are blood count using a Neubauer cell, photo-spectrometry using two commercial photometers calibrated for canine semen (Accuread®, SDM1®) and finally counting with a CASA analyzer (Hamilton Thorne, IVOSII).

Eight exploitable ejaculates were harvested, then the sperm fraction of each sample was divided into two aliquots, one left fresh and the other mixed with a cloudy opaque egg yolk.

Each of the two aliquots was divided into five fractions evaluated respectively by Neubauer cell, Accuread, SDM1, CASA with motile spermatozoa and finally CASA after immobilization of the sperm cells.

The results suggest that the different techniques evaluated are comparable to the reference technique with the exception of Accuread in the case of sperm diluted in an egg yolk medium.

Comparing the different evaluation techniques between fresh and opaque media also suggests that all the methods studied are equally reliable in both situations except Accuread®.

« ملخص »

يتكون العمل الحالي في المقارنة بين ثلاث طرق لتقييم تركيز الحيوانات المنوية في الكلب ، في وسائل شفافة وغير شفافة. هذه التقنيات عبارة عن تعداد دم باستخدام خلية Neubauer ، وقياس الطيف الضوئي باستخدام مقياسين ضوئيين تجاريين يتم معايرتهما من أجل كلاب المنى (Accuread® ، SDM1®) ثم العد أخيراً باستخدام محلل (CASA (Hamilton Thorne). (IVOSII).

تم حصاد ثماني قاذفات قابلة للاستغلال ، ثم تم تقسيم جزء من الحيوانات المنوية من كل عينة إلى قسمتين ، إحداهما تركت طازجة والأخرى مختلطة مع صفار البيض الغامض المعتم.

تم تقسيم كل واحدة من قسامة إلى خمسة كسور تقييمها على التوالي من قبل خلية Neubauer ، Accuread ، SDM1 ، CASA مع الحيوانات المنوية المتحركة وأخيراً CASA بعد تجميد خلايا الحيوانات المنوية.

تشير النتائج إلى أن التقنيات المختلفة التي تم تقييمها يمكن مقارنتها بالتقنية المرجعية مع استثناء Accuread في حالة الحيوانات المنوية المخففة في وسط صفار البيض.

تشير مقارنة أساليب التقييم المختلفة بين الوسائط الجديدة وغير المعتمدة أيضاً إلى أن جميع الطرق التي تمت دراستها موثوقة بنفس القدر في كلتا الحالتين باستثناء Accuread®.

Sommaire

| | |
|--------------------|---|
| Introduction | 1 |
|--------------------|---|

| |
|-----------------------|
| ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE |
|-----------------------|

| | |
|--------------------|---|
| Généralité : | 3 |
|--------------------|---|

| | |
|---|---|
| Chapitre I : Anatomie et physiologie de l'appareil génital mâle. | 3 |
|---|---|

| | |
|---|---|
| A. Les testicules et les voies spermatiques | 3 |
|---|---|

| | |
|---------------------|---|
| 1. Anatomie : | 3 |
|---------------------|---|

| | |
|--------------------------------|---|
| 2. Rôle des testicules : | 5 |
|--------------------------------|---|

| | |
|---|---|
| - La fonction endocrine ou sécrétion d'hormones : | 5 |
|---|---|

| | |
|--|---|
| - La fonction exocrine ou spermatogénèse : | 6 |
|--|---|

| | |
|----------------|---|
| B. Pénis | 7 |
|----------------|---|

| | |
|---------------------|---|
| 1. Anatomie : | 7 |
|---------------------|---|

| | |
|------------------------|---|
| 2. Physiologie : | 8 |
|------------------------|---|

| | |
|----------------------------------|---|
| C. Les glandes accessoires | 9 |
|----------------------------------|---|

| | |
|--------------------|---|
| Généralité : | 9 |
|--------------------|---|

| | |
|------------------------|---|
| 1. La prostate : | 9 |
|------------------------|---|

| | |
|------------------------------------|----|
| 2. Les glandes préputiales : | 10 |
|------------------------------------|----|

| | |
|---------------------------------------|----|
| Chapitre II : La semence canine | 10 |
|---------------------------------------|----|

| | |
|--|----|
| A. Caractéristiques générales de la semence canine. | 10 |
|--|----|

| | |
|---|----|
| B. Composition de la semence canine. | 11 |
|---|----|

| | |
|-----------------------------|----|
| 1. Le liquide séminal. | 11 |
|-----------------------------|----|

| | |
|--------------------------|----|
| B.1.1 Définition : | 11 |
|--------------------------|----|

| | |
|---------------------------|----|
| B.1.2 Composition : | 11 |
|---------------------------|----|

| | |
|---------------------------|----|
| 2. Le spermatozoïde. | 12 |
|---------------------------|----|

| | |
|--------------------------|----|
| B.2.1 Définition : | 12 |
|--------------------------|----|

| | |
|--|----|
| B.2.1 Description du spermatozoïde : | 13 |
|--|----|

| | |
|---------------------------------------|----|
| C. Récolte de la semence canine. | 15 |
|---------------------------------------|----|

| | |
|--|----|
| 1. Objectifs de la récolte de sperme : | 15 |
|--|----|

| | |
|---|----|
| 2. Différentes technique de récolte de sperme : | 15 |
|---|----|

| | |
|------------------------------|----|
| α. Matériel nécessaire | 15 |
|------------------------------|----|

| | |
|--|----|
| B. Mise en condition du chien..... | 16 |
| C. Stimulation digital | 17 |
| D. Causes d'échec de la récolte..... | 19 |
| E. Stockage de la semence après la récolte..... | 19 |
| Chapitre III : Spermogramme..... | 19 |
| A. Examen macroscopique :..... | 20 |
| Le volume : | 20 |
| La couleur, l'aspect :..... | 20 |
| PH : | 20 |
| L'odeur : | 20 |
| B. Examen microscopique :..... | 21 |
| i. Evaluation de la mobilité des spermatozoïdes :..... | 21 |
| ii. Evaluation de la concentration des spermatozoïdes « La numération » :..... | 22 |
| ii.1 Méthode manuelle..... | 22 |
| ii.2 Méthode automatisée..... | 22 |

| |
|----------------------------|
| ETUDE EXPERIMENTALE |
|----------------------------|

| | |
|---|----|
| I. Contexte et lieu d'étude : | 25 |
| II. Les animaux administrés :..... | 27 |
| III. Matériels et méthodes : | 28 |
| A- L'hémocytomètre de Neubauer amélioré | 28 |
| 1- Plaque de Neubauer ou hémocytomètre :..... | 28 |
| 3- Comptage des cellules étapes par étapes | 30 |
| ETAPE 1 : Préparation de l'échantillon. | 30 |
| Etape 2 : Introduction de l'échantillon dans la plaque de Neubauer..... | 31 |
| ETAPE 3 : Préparation et réglage du microscope | 33 |
| ETAPE 4 : Calculer le nombre total de spermatozoïdes. | 33 |
| ETAPE 5 : Calcul de la concentration | 35 |
| 4- Entretien de la chambre de comptage :..... | 35 |
| B- Le photomètre ACCUREAD | 36 |
| 1- Définition : | 36 |
| 2- Matériel utilisé..... | 36 |
| 3- Méthode de travail : | 37 |

| | |
|--|----|
| - Taux de dilution : | 37 |
| - Exécution d'une mesure : | 37 |
| 4- Résultat : | 38 |
| - Lecture : | 38 |
| - Causes d'erreurs : | 38 |
| 5- Nettoyage et entretien général de l'appareil: | 38 |
| C- Le photomètre SDM1 | 39 |
| 1- Définition : | 39 |
| 2- Matériels utilisée : | 40 |
| 3- Méthode de travail : | 40 |
| 4- Résultat : | 41 |
| - Lecture : | 41 |
| - Causes d'erreurs : | 41 |
| 5- Nettoyage et entretien général de l'appareil : | 42 |
| D- CASA (HAMILTON THORN IVOS II) | 42 |
| 1- Définition : | 42 |
| 2- Matériel utilisé : | 43 |
| 3- Méthode de travail : | 44 |
| - La dilution : | 44 |
| Remplissage de la chambre de comptage : | 45 |
| 4- Mesure : | 46 |
| IV. Résultats et discussion: | 47 |
| A. Résultats d'étude de la semence fraîche : | 47 |
| a. Les résultats de l'évaluation de la concentration dans le sperme frais: | 47 |
| b. La comparaison entre les différentes techniques d'évaluation de la concentration dans le sperme frais..... | 47 |
| c. Résultats de l'analyse de variance (ANOVA) sur sperme frais : | 48 |
| B. Résultats d'étude de la semence réfrigérée : | 49 |
| a. Les résultats de l'évaluation de la concentration dans le sperme réfrigéré:..... | 49 |
| b. La comparaison entre les différentes techniques d'évaluation de la concentration dans le sperme réfrigéré : | 49 |
| c. Résultats de l'analyse de variance (ANOVA) sur le sperme réfrigéré : | 50 |
| C. Résultats de l'étude comparative entre le sperme frais et réfrigéré : | 51 |

| | |
|---|----|
| a. La comparaison entre les différentes techniques d'évaluation de la concentration dans deux milieux différents :..... | 51 |
| Conclusion et recommandation | 53 |
| Bibliographie | 54 |

Liste des tableaux

| | |
|--|----|
| Tableau 1 : Description des trois phases de l'éjaculat du chien | 11 |
| Tableau 2 : Note d'appréciation subjective de la mobilité massale des spermatozoïdes dans un échantillon. | 21 |
| Tableau 3 : fiche de réception des chiens..... | 27 |
| Tableau 4 : Différences acceptables entre deux comptes de réplification pour..... une somme donnée sur la base de l'intervalle de confiance arrondi à 95%. | 35 |
| Tableau 5 : taux de dilution de la semence canine pour exécution d'une mesure au le photomètre ACCUREAD®. | 37 |
| Tableau 6 : les résultats obtenus avec les déférentes techniques d'analyses des semences à l'état frais. | 47 |
| Tableau 7 : résultats des ANOVA de la semence à l'état frais..... | 48 |
| Tableau 8 : les résultats obtenus avec les déférentes techniques d'analyses des..... semences diluer dans un diluant trouble. | 49 |
| Tableau 9 : les résultats des ANOVA de la semence réfrigérée..... | 50 |
| Tableau 10 : résultats des ANOVA de la comparaison entre la semence à l'état frais et réfrigérée. | 51 |

Liste des figures

| | | |
|--------------------|--|----|
| Figure 1 - | Organisation interne du testicule et de l'épididyme | 4 |
| Figure 2 - | Innervation et vascularisation du testicule..... | 4 |
| Figure 3 - | Organisation interne du testicule et fonction endocrine | 5 |
| Figure 4 - | Les différentes étapes de la spermatogenèse | 6 |
| Figure 5 - | Modifications morphologiques des cellules germinales en cours de la spermiogenèse | 7 |
| Figure 6 - | L'appareil génital mâle..... | 8 |
| Figure 7 - | Les trois phases de l'éjaculat du chien..... | 10 |
| Figure 8 - | Morphologie simplifiée du spermatozoïde..... | 13 |
| Figure 9 - | Organisation interne de la tête du spermatozoïde | 13 |
| Figure 10 - | Organisation interne du spermatozoïde..... | 14 |
| Figure 11 - | Matériel nécessaire à la récolte de la semence canine | 16 |
| Figure 12 - | Présence d'une femelle en œstrus lors de la récolte manuelle de semence canine ... | 17 |
| Figure 13 - | début de la récolte..... | 17 |
| Figure 14 - | soulèvement d'un postérieur | 18 |
| Figure 15 - | orientation caudale du pénis | 18 |
| Figure 16 - | Dépôt d'une goutte de semence sur une lame pour évaluation..... | 21 |
| Figure 17 - | Spectrophotomètre AccuRead® | 23 |
| Figure 18 - | CASA IVOS II (cliché issu de chez IMV technologies | 24 |
| Figure 19 - | le laboratoire de congélation de semence | 25 |
| Figure 20 - | banque de semence <i>de chez IMV technologie</i> | 25 |
| Figure 21 - | l'échographe de chez IMV technologie | 26 |
| Figure 22 - | laboratoire d'analyse de la semence | 26 |
| Figure 23 - | bloc de chirurgie | 26 |
| Figure 24 - | salle de production d'azote..... | 26 |
| Figure 25 - | les chiens qu'on a reçu (TIGRO, OSCAR, JUMPER) | 26 |
| Figure 26 - | l'étuve du laboratoire | 27 |
| Figure 27 - | Hémocytomètre de Neubauer amélioré) | 29 |
| Figure 28 - | Détail de la grille de la plaque de Neubauer | 29 |
| Figure 29 - | photo de la cellule de Neubauer | 29 |

| | |
|---|----|
| Figure 30 - Matériels nécessaire pour le comptage des cellules..... | 30 |
| Figure 31 - Les étapes de préparation du diluant(NaCl à 4%) | 31 |
| Figure 32 - homogénéisation de la solution à l'aide d'un vortex | 31 |
| Figure 33 - homogénéisation de la suspension pendant 10min | 31 |
| Figure 34 - Remplissage de la plaque de Neubauer | 32 |
| Figure 35 - Les deux cellules de Neubauer dans des chambres humides | 32 |
| Figure 36 - la mise en place de la cellule sur le microscope | 33 |
| Figure 37 - Les spermatozoïdes à compter..... | 33 |
| Figure 38 - Comptage avec concentration cellulaire élevée | 34 |
| Figure 39 - Compteur manuel de laboratoire..... | 34 |
| Figure 40 - Photomètre ACCUREAD | 36 |
| Figure 41 - le matériel utiliser pour effectuer une mesure au photomètre ACCUREAD..... | 36 |
| Figure 42 - les étapes d'exécution d'une mesure au photomètre ACCUREAD | 37 |
| Figure 43 - lecture sur photomètre ACCUREAD..... | 38 |
| Figure 44 - le photomètre SDM1 | 39 |
| Figure 45 - le matériel utilisé pour effectuer une mesure au photomètre SDM1..... | 40 |
| Figure 46 - les étapes d'exécution d'une mesure au photomètre SDM1..... | 40 |
| Figure 47 - HAMILTON THORN IVOS II | 43 |
| Figure 48 - Le matériel utilisé pour faire une évaluation à l'aide du CASA | 43 |
| Figure 49 - Les étapes pour diluer la semence | 44 |
| Figure 50 - Les étapes de préparation du diluant à base du jaune d'œuf..... | 45 |
| Figure 51 - Les étapes de remplissage de la lame Leja..... | 46 |
| Figure 52 - la mise en point de l'échantillon..... | 46 |
| Figure 53 - les étapes de mesure par le CASA | 46 |

Liste des abréviations

| | |
|-----------------|--|
| SPZ : | Spermatozoïdes. |
| Na Cl : | Chlorure de sodium. |
| N : | Nombre total des spermatozoïdes dans la cellule de Neubauer. |
| n : | Nombres de lignes comptés dans la cellule de Neubauer. |
| DEL : | Diode Électro Luminescente. |
| PC : | Personal Computer. |
| CASA : | Computer Assisted Semen Analysis. |
| NB : | Hémocytomètre de NEUBAUER. |
| OMS : | Organisation Mondiale de la Santé. |
| MOT: | Total Spermatozoal Motility. |
| PMOT: | Progressive Spermatozoal Mobility. |
| ALH: | Amplitude of Lateral Head Displacement. |
| VSL: | Straight-Line Velocity. |
| VCL: | Curvilinear Velocity. |
| BCF: | Beat Cross Frequency. |
| MAD: | Mean Angular Displacement. |
| (T) : | Trouble. |
| (F) : | Etat frais. |
| (R) : | Etat réfrigérée. |
| CMF : | Cytométrie en flux. |
| CERREC : | Centre d'étude et recherche en reproduction et élevage des carnivores. |
| Sum : | Somme. |
| DEL : | Diodes électroluminescentes. |

Introduction

Depuis plusieurs années la maîtrise de la reproduction canine s'est bien développée et les techniques de procréation médicalement assistée ont connu un essor grandissant. Dans ce domaine, l'analyse des différents paramètres spermatiques a pris une place importante. Parmi ces paramètres, l'évaluation de la concentration des spermatozoïdes revêt une importance capitale dans le spermogramme car c'est de cette caractéristique que dépendent les autres tel que la mobilité et la morphologie (*Pe a Mar nez 2004*). En effet, la concentration permet de déterminer le taux de fertilité d'un chien et le pouvoir fécondant d'un éjaculat (*Eilts, 2005a*). Et représente un intérêt certain pour l'exploitation des pères génétiquement supérieurs dans les programmes d'insémination artificielle (*Anzar et al. 2009*). Pour toutes ces raisons, il est impératif de disposer de techniques analytiques permettant d'avoir les résultats les plus précis possible.

La numération hématimétrique est considérée comme la méthode la plus fiable et la plus répandue depuis le 21^{ème} siècle, car elle est basée sur un comptage visuel au microscope en utilisant une cellule hématimétrique (de Malassez, de Thoma ou de Neubauer améliorée). Le guide de laboratoire d'analyse spermatique de l'OMS recommande l'utilisation de la cellule de Neubauer comme une technique de référence (*Guide OMS, 2010*).

Selon les recommandations de l'OMS, la numération au moyen de la cellule de Neubauer doit se faire dans le respect d'un protocole contraignant en matière de temps notamment avec la duplication de la dilution et de la lecture ainsi que le temps de décantation dans une chambre humide (*Guide OMS, 2010*). A la contrainte du temps s'ajoute celle d'évaluer la concentration spermatique dans les milieux de conservation opaques contenant du jaune d'œuf ou du lait comme stabilisants membranaires pour la réfrigération et la congélation de la semence.

Ainsi, malgré la précision qu'offre cette technique de référence, elle reste incompatible avec les conditions de travail dans les laboratoires de recherche et les centres de production de semence vu le nombre important de prélèvements à évaluer ainsi que l'obligation d'un résultat immédiat dans le contexte de production et de contrôle de qualité sur semence diluée dans un milieu opaque.

De cette problématique découle la nécessité de valider de nouvelles techniques devant assurer la rapidité d'analyse et la fiabilité par rapport à la technique de référence à l'état frais et dans les milieux opaques.

Les techniques les plus utilisées dans l'analyse spermatique sont la spectrophotométrie, le système CASA et la Cytométrie en flux. Cependant, la fiabilité de ces techniques par rapport à la méthode de référence demeure inconnue.

Ainsi, l'objectif de notre travail est la comparaison de deux méthodes automatiques à savoir la photométrie (Accuread®, SDM1®) et le système CASA (Hamilton Thorne IVOS II) à l'hématimètre de Neubauer comme étant une technique de référence.

Ce mémoire de fin d'études est scindé en deux parties: une première partie bibliographique organisée en trois chapitres, et une deuxième partie expérimentale comprenant le matériel et les méthodes utilisées, la présentation des résultats et leurs discussions et finalement la conclusion et les recommandations.

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Généralité :

La semence est constituée des spermatozoïdes, produits au cours de la spermatogenèse par les gonades mâles, et du liquide ou plasma séminal, produit par les glandes sexuelles. Les spermatozoïdes sont des cellules hautement spécialisées dont la fonction première est la fécondation de l'ovocyte dans le tractus génital femelle. Les spermatozoïdes sont produits en grande quantité mais peuvent présenter des anomalies structurelles à l'origine d'une diminution de la fertilité de la semence. C'est pourquoi l'évaluation de la qualité de la semence constitue une étape importante à l'état frais et également après la réfrigération.

Chapitre I : Anatomie et physiologie de l'appareil génital mâle.

Les organes reproducteurs du mâle possèdent trois principales fonctions : la production des spermatozoïdes dans le testicule, la maturation, le stockage et le transport des spermatozoïdes dans le canal déférent et le dépôt de la semence dans le tractus génital femelle via le pénis.

A. Les testicules et les voies spermatiques

1. Anatomie :

Les testicules sont des organes pairs mesurant trois à quatre centimètres de longueur sur trois centimètres de largeur et pesant une vingtaine de grammes chez un chien de grande race. Leur taille est proportionnelle au poids du chien. Les testicules ont une forme globuleuse, presque sphérique. Ils sont situés en région périnéale basse dans le scrotum. (*Barone, 1978 ; Collin, 2003*).

Les testicules sont constitués d'un parenchyme testiculaire parcouru par une structure fibreuse appelée l'albuginée et sont entourés d'une séreuse. Le parenchyme testiculaire se divise en lobules au sein desquels cheminent les tubes séminifères, lieu d'**élaboration des gamètes mâles**.

Les tubes séminifères convergent pour donner le *rete testis*. Entre les tubes séminifères, se trouve le tissu interstitiel. Le *retetestis* forme des canalicules efférents qui aboutissent aux 20 niveaux de la tête de l'épididyme. Le canal déférent prolonge l'épididyme et rejoint l'urètre au niveau du col de la vessie. L'urètre s'abouche au niveau du gland du pénis. L'urètre présente donc une double fonction chez le mâle : **l'excrétion urinaire et l'éjaculation**. (*Barone, 1978, Collin, 2003*).

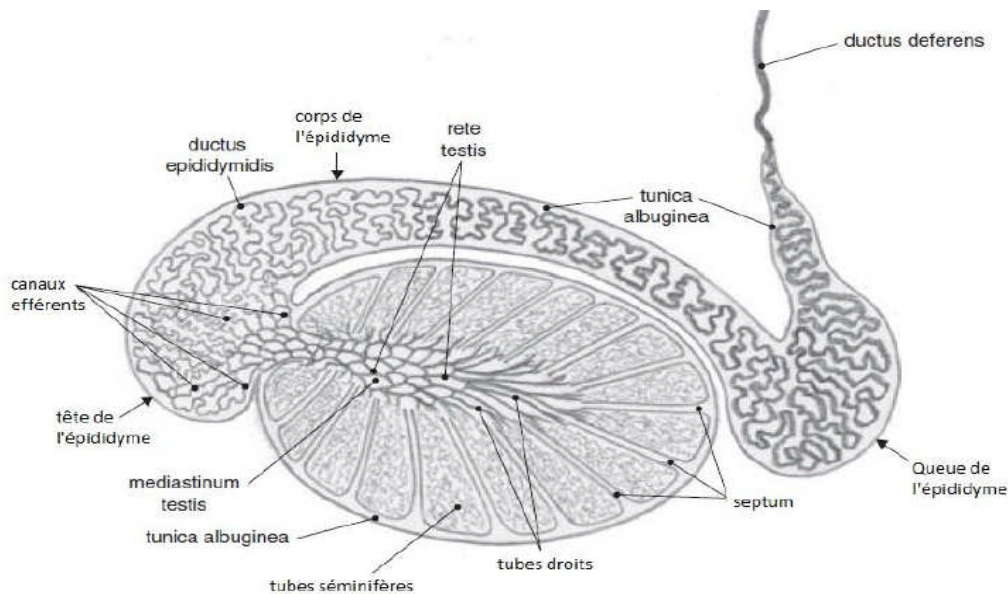


Figure 1 – Organisation interne du testicule et de l'épididyme (Schatten, 2007).

Les testicules sont très fortement vascularisés (Figure 2). Chaque testicule est irrigué par l'artère testiculaire, très tortueuse, issue de l'aorte abdominale, qui se divise en branches terminales irriguant le testicule mais aussi la tête et la queue de l'épididyme. Lorsqu'elle atteint le testicule, cette artère parcourt la surface de l'albuginée et pénètre ensuite le parenchyme testiculaire où chaque lobule est alimenté par une branche artérielle (Barone 2001, Jégou et al. 2014).

Les veines testiculaires partent directement vers la surface du parenchyme et se regroupent autour de l'artère testiculaire au niveau du cordon spermatique pour constituer le plexus pampiniforme qui permet le refroidissement du sang artériel et assure donc la thermorégulation du testicule. Les nerfs proviennent principalement du plexus mésentérique caudal et forment le plexus testiculaire. Ils se distribuent dans l'albuginée par des terminaisons sensibles libres. Il semblerait que les fibres nerveuses ne pénètrent pas dans les tubes séminifères (Barone 2001).

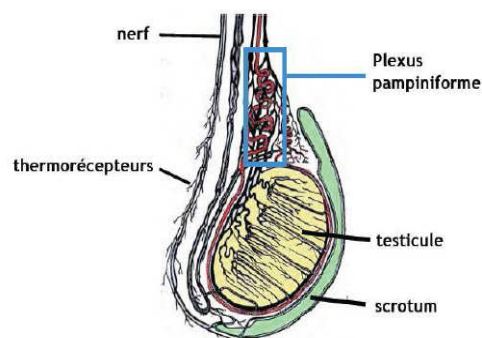


Figure 2 – Innervation et vascularisation du testicule (d'après : Senger, 2012).

2. Rôle des testicules :

- La fonction endocrine ou sécrétion d'hormones :

Les cellules de **Leydig** et de **Sertoli** sont responsables de la production d'hormones par les testicules (Figure 3). Les hormones mâles possèdent plusieurs fonctions : le maintien de la spermatogenèse, le développement d'une partie du comportement mâle et des caractéristiques physiques mâles.

- **Les cellules de Leydig** situées dans le tissu interstitiel des testicules sécrètent la **testostérone** et des hormones androgéniques (Reece 1997, Fontbonne et al., 2000). La testostérone joue un rôle dans le bon déroulement de la spermatogenèse. Elle intervient également sur le développement structurel et sur le fonctionnement physiologique des glandes sexuelles accessoires. Enfin, elle joue sur le développement des caractères sexuels secondaires et sur le développement et le maintien de la libido. (Reece, 1997, Johnston et al. 2001a).
- **Les cellules de Sertoli** situées dans la paroi des tubes séminifères sécrètent de nombreuses hormones dont l'activine, l'inhibine et l'oestradiol ainsi que plus d'une soixantaine de protéines. De plus, elles protègent, nourrissent et servent de support aux cellules souches. (Fontbonne, 1992, Johnston et al., 2001a).

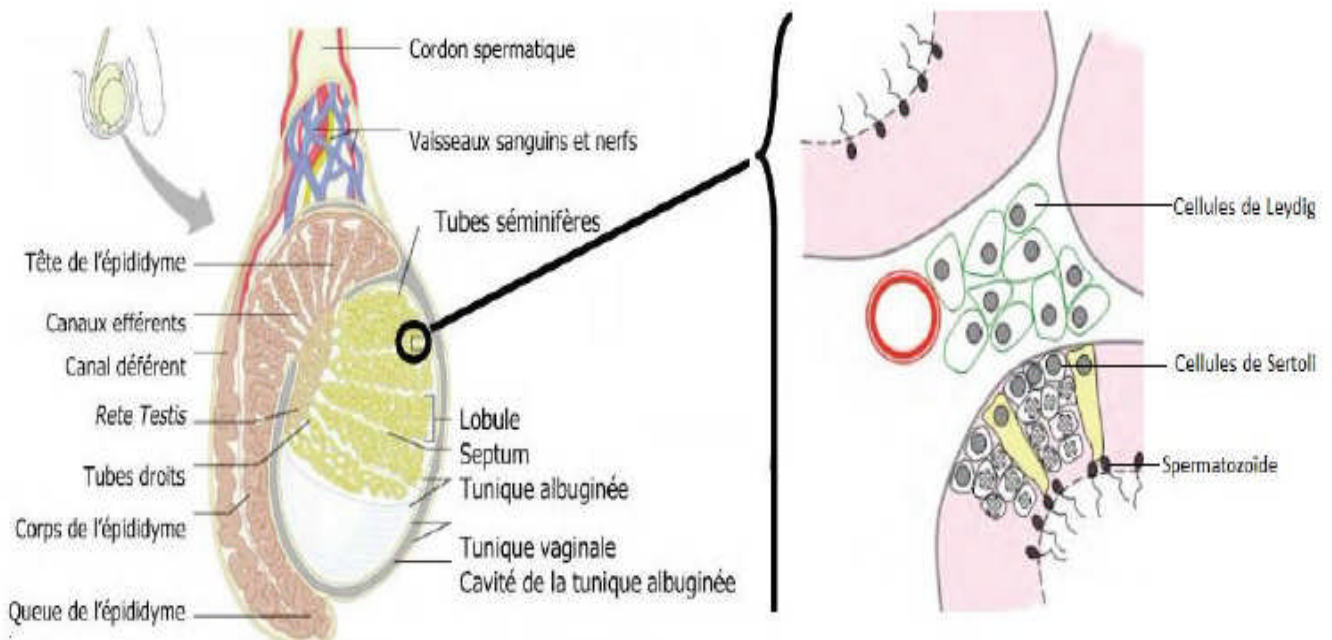


Figure 3 - Organisation interne du testicule et fonction endocrine (d'après: Senger, 2012).

- **La fonction exocrine ou spermatogénèse :**

La spermatogénèse est la production des gamètes mâles : les **spermatozoïdes**. La durée de la spermatogénèse n'est pas clairement établie (figure 4); elle varie de soixante-trois à soixante-dix jours suivant les auteurs (*Fontbonne et al., 2000*). La quantité de spermatozoïdes produits est proportionnelle à la taille du chien ; elle varie de deux cent millions à plus de deux milliards de Spermatozoïdes par éjaculat (*Fontbonne, 1992*).

La spermatogénèse se déroule au sein de la paroi des tubes séminifères en deux étapes successives : **la spermatocytogénèse**, méiose qui permet de passer du stade spermatogonie au stade spermatide et la **spermiogénèse** qui permet la différenciation des spermatides en spermatozoïdes.

Les spermatozoïdes sont finalement libérés dans la lumière des tubes séminifères au cours de la spermiation. Les spermatogonies souches se renouvellent par Les spermatozoïdes immatures libérés dans la lumière des tubes séminifères rejoignent l'épididyme au niveau duquel ils vont acquérir leur mobilité et leur aptitude à féconder au cours de deux processus distincts : c'est la **maturation épидидymaire** qui s'effectue sous contrôle androgénique. Au cours de cette maturation épидидymaire, le noyau des spermatozoïdes subit une condensation importante et de nombreuses modifications lipidiques et protéiques intéressent la membrane plasmique (figure n°5). La grande majorité des spermatozoïdes (70 %) sont ensuite stockés dans la queue de l'épididyme (*Reece, 1997*). Après une abstinence prolongée, la qualité de la semence peut être altérée du fait d'une sur maturation épидидymaire. (*Fontbonne, 1992 ; Johnston et al. 2001a*).

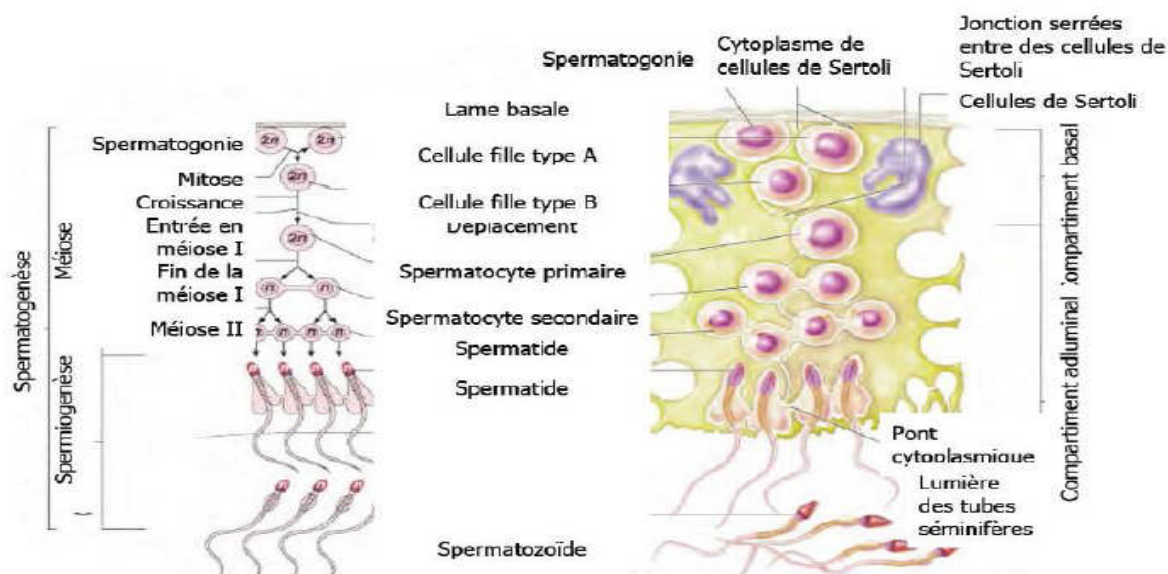


Figure 4 - Les différentes étapes de la spermatogénèse (*Senger, 2012*)

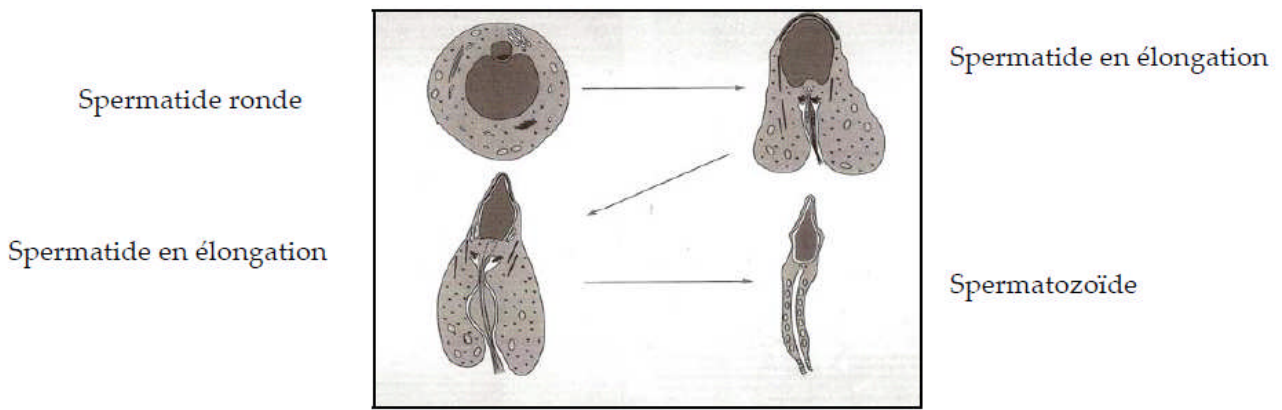


Figure 5 - Modifications morphologiques des cellules germinales cours de la spermiogenèse.
(D'après Fontbonne, 1992)

B. Pénis

1. Anatomie :

La longueur moyenne du pénis varie de six à vingt-cinq centimètres selon la taille du chien. Le pénis est composé de trois parties : **la racine** et **le corps** qui sont les éléments fixes du pénis et **le gland** qui constitue sa partie libre. En dehors de l'érection, le pénis est totalement recouvert par une enveloppe cutanée : le fourreau (*Barone, 1978 ; Collin, 2003*).

La racine est constituée des corps caverneux, tissu peu érectile qui s'ossifie pour devenir l'os pénien dans la partie libre du pénis et qui permet la pénétration de la femelle lorsque l'érection n'est pas maximale (*Johnston et al. 2001a, Collin, 2003*). Le gland du pénis est divisé en deux parties, une partie allongée cranialement et une partie renflée caudale : **le bulbe érectile**. Le bulbe érectile génère de nombreux influx nerveux ; c'est cette zone qui doit être stimulée lors de la masturbation. Le gland est constitué du corps spongieux qui est un tissu érectile (figure n°6). Il faut noter la présence du muscle rétracteur du pénis qui intervient en fin d'érection pour ramener le pénis en position de repos. (*Collin, 2003*).

La vascularisation du pénis provient de l'artère du pénis. Cette artère donne de nombreuses artères qui cheminent au sein du pénis. Les artères sont flexueuses ; cette forme leur permet de s'adapter au changement de taille du pénis lors de l'érection. De nombreuses veines collectent le sang et se rejoignent pour finalement donner les veines du pénis qui rejoignent la veine honteuse Interne. (*Barone, 1978*).

(Fontbonne, 1992). L'érection est sous contrôle du système parasympathique via le nerf érecteur d'Eckard à l'origine d'une vasodilatation et du système orthosympathique qui entraîne une contraction des fibres musculaires lisses (Fontbonne, 1992). L'érection débute par un afflux de sang dans le corps caverneux et par une augmentation de pression dans le corps spongieux. Puis, La relaxation des muscles lisses entraîne une diminution de la résistance et une augmentation du flux artériel. L'augmentation de pression entraîne l'obstruction des veines empêchant ainsi le retour veineux (Reece, 1997, Johnston et al., 2001a). Suite à l'érection, il y a accumulation de sperme sous pression et contraction de la prostate et des canaux déférents.

La pression augmente jusqu'à l'ouverture du sphincter qui conduit à **l'éjaculation**. L'éjaculation est sous contrôle du système sympathique via le nerf honteux et du système orthosympathique via le nerf hypogastrique. (Johnston et al. 2001a) Différentes zones peuvent être stimulées pour déclencher l'éjaculation notamment lors de la masturbation. Il s'agit du bulbe érectile, de la pointe du gland, de la face interne des cuisses et du périnée. (Fontbonne, 1992, Johnston et al. 2001a).

C. Les glandes accessoires

Généralité :

Les sécrétions des glandes accessoires participent à la formation du plasma séminal et représentent 50 à 95% du volume total du plasma séminal. La contribution de chacune des glandes varie considérablement en fonction des espèces (Dacheux et al. 2001).

Les glandes accessoires appartiennent toutes à la partie pelvienne de l'urètre. Leurs sécrétions s'y déversent peu avant l'éjaculation pour donner au sperme sa composition définitive ainsi qu'un volume plus important à l'éjaculat. Leur développement est contrôlé par la sécrétion hormonale du testicule lui-même, sous contrôle de l'axe hypothalamo-hypophysaire (Barone 2001).

1. La prostate :

La prostate est une **glande** située en position rétro-péritonéale. Elle enserre l'urètre au niveau du col de la vessie. Elle est constituée d'un corps bilobé et d'une partie disséminée. Le corps de la prostate mesure deux à trois centimètres chez un chien de taille et d'âge moyen. (Collin, 2003).

Cette glande joue un rôle primordial dans l'élaboration du sperme. **Les sécrétions prostatiques** représentent les trois quart du volume spermatique. Les rôles de ces sécrétions sont multiples : effet tampon contre le pH vaginal, action bactériostatique, participation à la fin

de la maturation des spermatozoïdes, propriétés immunosuppressives dirigées contre les éléments du tractus génital femelle. (Fontbonne, 1992, Johnston et al. 2001a).

2. Les glandes préputiales :

Ces glandes sébacées situées à la base du gland joueraient un rôle lubrifiant et sécrèteraient des phéromones. (Fontbonne, 1992).

Chapitre II : La semence canine

La semence canine est un liquide contenant les gamètes mâles (les spermatozoïdes) et les sécrétions provenant des glandes sexuelles accessoires. Ces deux éléments se mélangent lors de l'éjaculation. (Prings, 1998).

A. Caractéristiques générales de la semence canine.

L'**éjaculat** du chien est un liquide blanchâtre. Le volume de l'éjaculat dépend de la race et de l'individu ; sa concentration en SPZ est de 60 millions de SPZ par ml en moyenne (de 20 à 110) (Vallon, 1971). L'éjaculat du chien est composé de **trois fractions** présentant des caractéristiques différentes tant au niveau de leur origine que de leur composition et de leur volume (figure n°7 et tableau n°1).

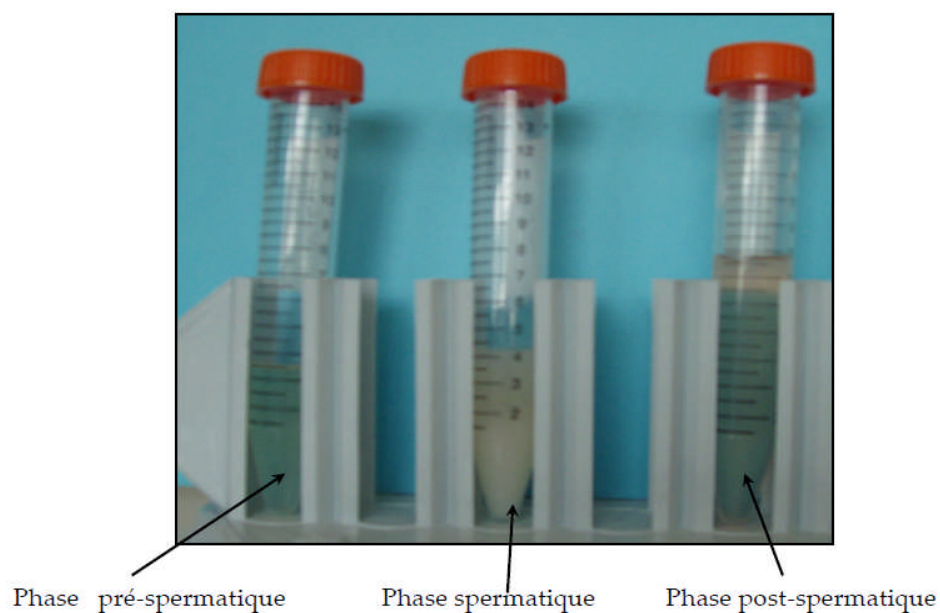


Figure 7 - Les trois phases de l'éjaculat du chien.

Tableau 1 : Description des trois phases de l'éjaculat du chien (Fontbonne et Dumont, 1992).

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

B. Composition de la semence canine.

1. Le liquide séminal.

B.1.1 Définition :

Le **liquide séminal** est composé de fluides excrétés, de cellules et de débris cellulaires provenant des glandes sexuelles accessoires. Certains éléments du liquide séminal proviennent de la filtration du plasma sanguin tandis que d'autres sont produits par les glandes sexuelles. (*Prings, 1998*).

Les rôles du liquide séminal sont doubles. Le liquide séminal intervient à la fois dans **le transport et la nutrition des spermatozoïdes**. Cependant, ce liquide n'est pas absolument nécessaire à la fécondation. En effet, il augmente le pouvoir fécondant des spermatozoïdes. (*Prings, 1998*).

B.1.2 Composition :

Le liquide séminal est composé à 90% d'eau et il contient également différents composants (*Prins 1998*) :

➤ **Des glucides :**

Les glucides constituent le substrat énergétique nécessaire au métabolisme des spermatozoïdes. Le sperme canin est particulièrement pauvre en fructose contrairement à celui des autres mammifères. Ceci est à mettre en relation avec l'absence de glande vésicale chez le chien.

Cependant, les spermatozoïdes de chien ont gardé la capacité d'utiliser le fructose par les voies aérobie et anaérobie. (Cole et Cupps, 1959).

➤ **Des lipides :**

Une partie des lipides est d'origine prostatique ; ces derniers peuvent former des corpuscules réfringents de lécithine ou des corps amylicés. (Fontbonne et Dumont, 1992).

➤ **Des protéines :**

Une partie des protéines provient du plasma sanguin comme l'albumine, la globuline, la transferrine, les glycoprotéines et les immunoglobulines ; les autres sont sécrétées par la prostate (Cole et Cupps, 1959 ; Prings, 1998).

➤ **Des ions et des électrolytes :**

Comme le calcium qui est nécessaire au fonctionnement des spermatozoïdes, du sodium, du chlore, du zinc d'origine prostatique, il posséderait un pouvoir bactériostatique, du potassium, du fer... (Prings, 1998).

➤ **Des hormones :**

Hormones stéroïdiennes, prolactine (hormone qui stimulerait la mobilité des spermatozoïdes et qui augmenterait leur longévité)... (Prings, 1998).

➤ **Diverses autres molécules :**

- De l'acide citrique en faible quantité. (Cole et Cupps, 1959).
- De la glycérylphosphorylcholine, d'origine épидидymaire.. (Prings, 1998).
- Des microorganismes de la flore naturelle des muqueuses pénienne et préputiale peuvent être retrouvés. (Johnston et al. 2001b).

2. Le spermatozoïde.

B.2.1 Définition :

Le spermatozoïde correspond au gamète mâle, il transporte l'information génétique dans le tractus génital femelle et la délivre à l'intérieur de l'ovocyte. Afin d'accomplir cette mission, le spermatozoïde est hautement différencié (Barone 2001, Ponthier et al. 2014).

c'est une cellule **haploïde** hautement **spécialisée**, de forme oblongue. Il mesure soixante deux à soixante six micromètres ; la queue mesure à elle seule cinquante-cinq micromètres. (*Fontbonne et Dumont, 1992*). Il présente de nombreuses différences par rapport aux cellules somatiques. Par exemple, la teneur en eau des spermatozoïdes est très inférieure à celle des cellules somatiques. Ceci est à mettre en relation avec la relative pauvreté des spermatozoïdes en cytoplasme et avec le haut degré de condensation de la chromatine (*Millette, 1998*). (Figure n°8).

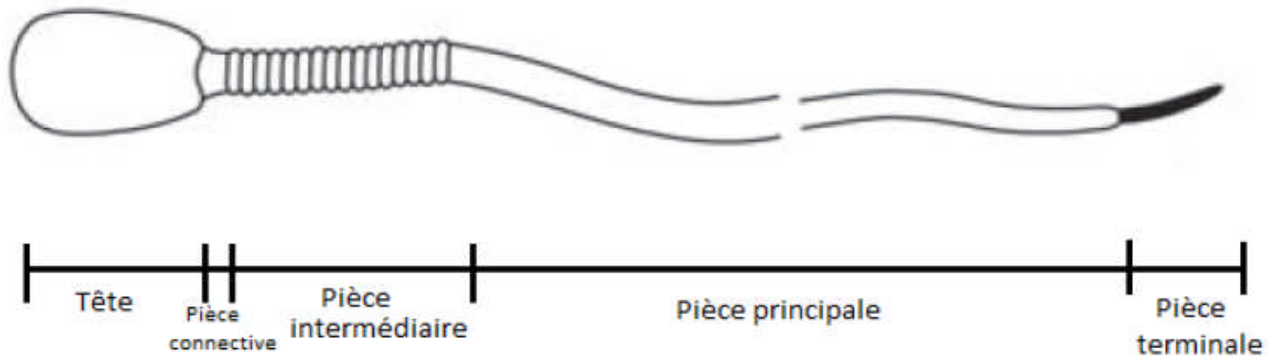


Figure 8 - Morphologie simplifiée du spermatozoïde (d'après: *Schatten et al. 2007*).

B.2.1 Description du spermatozoïde :

❖ La tête :

La tête constitue la partie essentielle du spermatozoïde, car elle est presque entièrement composée du noyau et renferme donc la chromatine, elle est aplatie dorso-ventralement. Elle contient le noyau, l'acrosome, le cytosquelette et le cytoplasme. (Voir Figure 9).

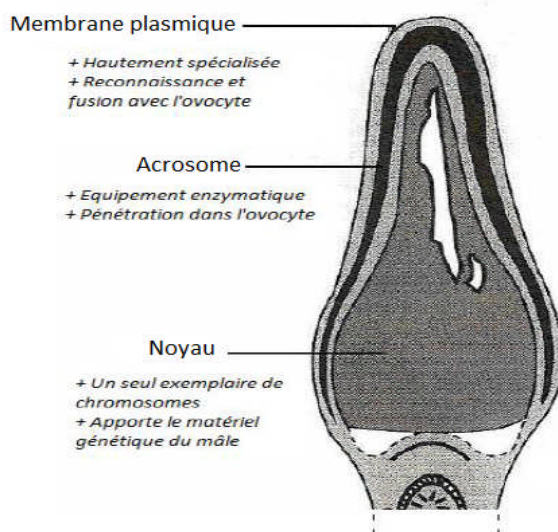


Figure 9 - Organisation interne de la tête du spermatozoïde (*Dadoune, 2001*).

❖ **La membrane cytoplasmique :**

La membrane plasmique constitue la barrière avec le milieu extérieur. Contrairement aux membranes cytoplasmiques des cellules somatiques, cette membrane est hautement spécialisée. Elle est divisée en micro-domaines où des protéines et des lipides spécifiques y sont fixés et dont le rôle est de réguler la physiologie et les fonctions du spermatozoïde. Au niveau de la pièce intermédiaire du flagelle, la membrane plasmique contient des protéines nécessaires à la production de l'ATP mitochondriale et nécessaires à la modulation du glissement des microtubules. Au niveau de la tête des spermatozoïdes, la membrane plasmique renferme des protéines intervenant dans la reconnaissance cellulaire entre le spermatozoïde et l'ovocyte et dans la fusion des membranes au cours de la fécondation (Millette 1998; Ponthier et al. 2014). La membrane plasmique subit des changements de composition au cours du transit des spermatozoïdes.

❖ **Le flagelle:**

Le flagelle constitue l'élément moteur du spermatozoïde, il lui permet d'atteindre l'ovocyte dans les voies génitales femelles et de pénétrer ce dernier, il s'attache à la tête du spermatozoïde via une pièce connective ou le col. Il comprend trois parties successives: (Figure 10) :

- **La pièce intermédiaire** fait directement suite au col et constitue la partie la plus épaisse de la queue. Elle est formée de l'axonème entouré d'une couche de fibres denses et d'une gaine de mitochondries disposées en hélice et produisant l'ATP. Cette gaine mitochondriale est indispensable à la production d'énergie nécessaire au mouvement du flagelle.
- **La pièce principale**, de loin la plus longue, comporte simplement l'axonème et les fibres denses qui s'amincissent en allant vers la pièce terminale.
- **La pièce terminale**, la gaine et les fibres denses font défaut et seul le filament axial est présent (Barone 2001; Brito 2007; Ponthier et al. 2014).

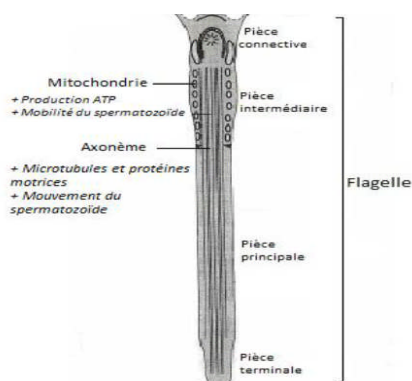


Figure 10 - Organisation interne du spermatozoïde (Dadoune, 2001).

C. Récolte de la semence canine.

1. Objectifs de la récolte de sperme :

Différentes techniques sont actuellement disponibles pour la récolte de semence et toutes permettent d'obtenir une semence de qualité (dans les capacités de l'animal prélevé), mais dont les caractéristiques diffèrent fortement en fonction de la technique utilisée. Lors de la récolte de semence, il faut toujours d'obtenir une semence de la meilleure qualité possible tout en infligeant un stress minimum à l'animal.

La récolte de sperme peut avoir plusieurs objectifs :

- la réalisation d'une insémination artificielle.
- la conservation du sperme : cryoconservation ou réfrigération.
- l'évaluation de la qualité de la semence dans différents cas : chez un vieux chien, chez des animaux qui n'ont pas reproduit depuis longtemps, chez des mâles pour lesquels plusieurs essais de saillies/inséminations n'ont pas abouti à une gestation ou qui ont engendré de petites portées ou enfin simplement avant une saillie afin d'évaluer la qualité de la semence.
- l'objectivation d'une affection : une évaluation de la semence peut-être indiquée en cas d'écoulements au niveau du prépuce, d'hématospermie ou d'hématurie. (*Fontbonne et al. 1992, Kutzler 2005*).

2. Différentes technique de récolte de sperme :

La méthode la plus utilisée actuellement pour le prélèvement de semence chez le chien est la récolte manuelle **par stimulation digitale**. Cette méthode simple a été utilisée dès 1780 par l'abbé Spallanzani (*Fontbonne et Dumont, 1992*). D'autres méthodes peuvent être également citées bien que beaucoup moins utilisées telle que l'utilisation du **vagin artificiel**.

La récolte par stimulation digitale:

α. Matériel nécessaire

Le matériel nécessaire à la récolte de la semence par stimulation digitale est simple : des **cônes en caoutchouc** raccordés à des **tubes de centrifugation** stériles en plastique. D'autres récipients peuvent être utilisés mais il faut éviter les récipients en verre qui pourrait blesser le pénis du chien

lors du prélèvement (*Fontbonne et Dumont, 1992*). Avant la récolte, il faut préparer trois cônes ajustés sur des tubes de centrifugation afin de pouvoir séparer les trois phases de l'éjaculat. La taille des cônes est fonction du gabarit du chien (figure n°11). L'idéal est de laisser les cônes dans une étuve afin qu'ils soient tièdes au moment du prélèvement. (*Fontbonne et Dumont, 1992*).

Le nettoyage des cônes doit être effectué avec soin. Les cônes doivent être abondamment rincés car les détergents sont pour la plupart spermicides. Puis, les cônes doivent être soigneusement séchés afin d'ôter les résidus d'eau qui sont toxiques pour les spermatozoïdes. (*Fontbonne et Dumont, 1992*).

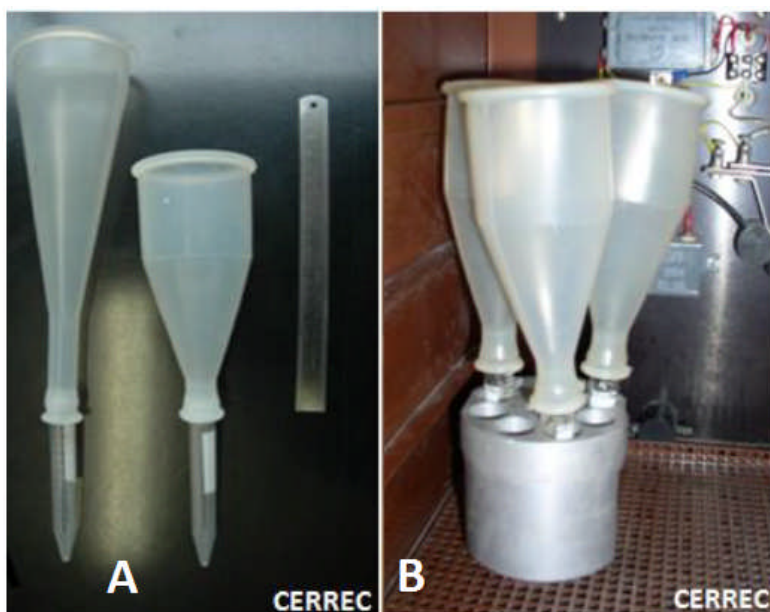


Figure 11 - Matériel nécessaire à la récolte de la semence canine :

A : différentes tailles de cônes en fonction de la race de chien récolté. (Cliché CERREC), Centre d'Etude et recherche en Reproduction et Elevage Canin.

B : trois tubes stériles gradués et leur cône en plastique placés dans un portetube métallique conservant la chaleur. Cliché réalisé au CERREC).

B. Mise en condition du chien

Le prélèvement doit être effectué dans un endroit **calme**, peu bruyant, en présence d'un nombre restreint de personnes. La salle doit être de taille modérée et le sol ne doit pas être glissant. Selon les cas, le maître doit ou ne doit pas être présent. En effet, certains chiens seront inhibés par la présence du propriétaire alors que d'autres seront stimulés par celle-ci. (*Fontbonne et Dumont, 1992*).

La présence d'une **chienne en œstrus** (Voir Figure n°12) est recommandée sans être absolument nécessaire. Cependant, elle peut faciliter la récolte de chiens timides, à faible libido ou nerveux. De plus, la présence d'une chienne en chaleur augmente la qualité de l'éjaculat. (*Johnston et al. 2001b*).

Des **phéromones** synthétiques peuvent être appliquées sur la vulve et l'arrière train d'une femelle en œstrus voire sur un mâle castré (*Feldman et Nelson, 1987*). Plus simplement, des écouvillons de chiennes en œstrus peuvent être conservés à - 20 °C et présentés à la truffe du mâle pendant le prélèvement ou être appliqués à la base de la queue d'une chienne. (*Kutzler, 2005*).



Figure 12 - Présence d'une femelle en œstrus lors de la récolte manuelle de semence canine (Cliché CERREC).

C. Stimulation digital

Si l'opérateur est droitier, il se positionne à gauche du chien. Sa main droite masse le pénis du chien tandis que la gauche tient le cône de récolte. Le propriétaire se tient à la droite du chien au niveau de la tête et il oriente la tête du chien vers la vulve de la chienne si celle-ci est présente (*Feldman et Nelson, 1987, Kutzler 2005*). Le chien peut chevaucher la chienne.

La récolte débute par un massage vigoureux en arrière des bulbes érectiles à travers le fourreau jusqu'à l'obtention de l'érection partielle. Le prépuce est alors récliné en arrière des bulbes érectiles (figure n°13).



Figure 13 - début de la récolte. La tête du chien est maintenue par le propriétaire et orientée vers l'arrière train de la femelle. Massage en arrière des bulbes, retrait du fourreau et application d'une pression en arrière des bulbes (Cliché CERREC).

Parfois, le fourreau ne peut pas être repoussé en arrière des bulbes érectiles notamment lorsque les bulbes sont trop engorgés ou lorsque le chien souffre d'un paraphimosis (Kutzler, 2005 ; Fontbonne et Dumont, 1992). Le chien éprouve dans ce cas de l'inconfort voire de la douleur et l'érection peut s'arrêter (Feldman et Nelson, 1987). Une pression est ensuite appliquée à l'arrière des bulbes érectiles avec le pouce et l'index. Cette pression mime la coaptation vaginale du pénis lors du coït (Fontbonne et Dumont, 1992). Le chien va présenter des mouvements de bassin d'avant en arrière pendant quelques minutes puis il va s'arrêter et soulever un postérieur pour essayer de se retourner (figure n°14).



Figure 14 - soulèvement d'un postérieur (Cliché CERREC).

Le pénis peut alors être orienté caudalement. La pression en arrière des bulbes érectiles doit être maintenue (Kutzler, 2005). A ce stade, l'érection est totale et l'éjaculation des deux premières phases a lieu ; elle dure entre deux et cinq minutes (Feldman et Nelson, 1987). Si l'érection a tendance à diminuer, un massage de l'urètre périnéal peut être nécessaire (Fontbonne et Dumont, 1992).

La séquence se poursuit par l'éjaculation de la troisième phase ; la récolte intégrale de celle-ci n'est pas nécessaire car elle peut être longue. Il est cependant important de récolter une quantité suffisante de la troisième phase afin d'en observer l'aspect (figure n°15).



Deuxième phase

Echange des cônes pour récupérer la troisième phase

Figure 15 - orientation caudale du pénis (Cliché CERREC).

Après la récolte, le chien est promené plusieurs minutes afin de faciliter le récalottage du pénis dans le fourreau. Avant le départ du chien, il est important de vérifier que le pénis est entièrement recouvert par le prépuce et qu'il n'y a pas de poils coincés dans l'orifice préputial ni d'éversion de la membrane préputiale. (*Kutzler, 2005*).

D. Causes d'échec de la récolte.

Il existe des causes :

- **liées au chien.** Il peut y avoir des échecs de récolte lorsque le chien est trop âgé ou au contraire lorsqu'il est jeune et inexpérimenté, lorsque le chien a eu des expériences sexuelles négatives ou enfin lorsqu'il souffre d'une pathologie de l'appareil urogénital telle qu'une fracture ancienne de l'os pénien ou des calculs urétraux.
- **liées à l'environnement** comme un excès de bruit ou un nombre trop important de personnes.
- **liés à l'expérimentateur.** Une stimulation trop ferme ou à l'inverse trop douce peut aboutir à un échec du prélèvement. (*Feldman et Nelson, 1987, Fontbonne et Dumont, 1992*).

E. Stockage de la semence après la récolte

La semence est sensible au froid qui entraîne un choc thermique mais également au chaud. La semence est donc conservée à **température ambiante** durant son évaluation. (*Fontbonne et Dumont, 1992*).

Chapitre III: Spermogramme.

L'évaluation de la semence est une étape importante pour estimer la fertilité du mâle (*Eilts, 2005a*). Le spermogramme comprend l'étude du sperme, c'est-à-dire la détermination du volume et de la couleur de l'éjaculat ainsi que de la concentration en spermatozoïdes, du nombre total de spermatozoïdes et du pourcentage de spermatozoïdes mobiles dans l'éjaculat (*Pe a Mar nez 2004*).

Dans cette partie, nous évoqueront les examens de routine, réalisables par le vétérinaire et nécessitant peu de matériel, les examens réalisés en seconde intention et les nouvelles méthodes d'études du sperme utilisées dans les centres spécialisés.

A. Examen macroscopique :

Le volume :

Le volume de l'éjaculat est évalué par lecture directe sur le tube de collecte gradué juste après la récolte, La mesure du volume donne quelques indications, si celui-ci est trop faible, il se peut que la phase spermatique n'ait pas été entièrement (*Fontbonne et Dumont, 1992*). Le volume est également important pour calculer le nombre total de spermatozoïdes dans l'éjaculat. (*Johnston et al. 2001b*).

La couleur, l'aspect :

L'aspect de l'éjaculat est un élément important. Par exemple, l'opacité de la phase spermatique donne une première indication sur la concentration en spermatozoïdes de l'éjaculat. Normalement, la semence présente un aspect blanc laiteux, homogène mais trouble (Figure 30). Elle est également inodore. La présence d'une odeur anormale peut évoquer une contamination de l'éjaculat par de l'urine, du pus ou des bactéries (*Johnston et al. 2001*).

Certaines modifications de couleur peuvent orienter vers des affections spécifiques : la couleur jaune indique la présence d'urine ou la présence d'un exsudat inflammatoire ; la couleur verte met en évidence la présence de pus ; la couleur rouge ou brune indique la présence de sang respectivement en nature ou digéré (*Johnston et al. 2001*).

Lorsque la couleur de la semence est anormale, la cause peut être établie par observation microscopique.

PH :

Le pH doit être compris **entre 6.4 et 6.8**. Il est important d'effectuer cette analyse lors d'asthénozoospermie afin d'écartier une affection de la prostate, de l'urètre ou de la vessie (*Fontbonne et Dumont, 1992*). De plus, la mesure du pH est intéressante à connaître si une antibiothérapie doit être entreprise, les antibiotiques étant inhibés à certaines valeurs de pH (*Freshman, 2002*).

L'odeur :

L'odeur du sperme donne peu d'indication. Normalement, il doit être **inodore**. La présence d'une odeur anormale peut évoquer une contamination de l'éjaculat par de l'urine, du pus ou des bactéries. (*Fontbonne, 1995*).

B. Examen microscopique :

i. Evaluation de la mobilité des spermatozoïdes :

L'estimation de la mobilité par observation au microscope est la méthode la plus simple, la plus rapide et la moins chère pour évaluer la qualité du sperme bien qu'elle soit subjective et ne constitue donc pas une méthode répétable par différentes personnes pour prédire le pouvoir fécondant de la semence observée (*ohnston et al. 2001; Freshman 2002; Pe a Mar nez 2004*).

Lors d'une évaluation au microscope, on observe une goutte de phase spermatique déposée entre lame et lamelle (Figure n16). Idéalement, l'observation doit se faire sur un microscope à contraste de phase, muni d'une platine chauffante à 37°C pour éviter un ralentissement des spermatozoïdes dû à leur refroidissement. Si la semence est trop concentrée, une dilution peut être réalisée avec du fluide prostatique, une solution saline isotonique ou une solution tampon.



Figure 16 - Dépôt d'une goutte de semence sur une lame pour évaluation.

Une note variant de zéro à cinq est attribuée par l'observateur (Tableau 2). Cette observation simple mais peu précise est révélatrice à la fois de la vitesse de progression et de la concentration des spermatozoïdes (*Fontbonne et al. 1992*).

Tableau 2 - Note d'appréciation subjective de la mobilité massale des spermatozoïdes dans un échantillon (*d'après: Fontbonne, 1992*).

| Note | Interprétation |
|------|--|
| 0 | Pas de mouvement |
| 1 | Spermatozoïdes en mouvement mais pas de mouvement d'ensemble |
| 2 | Ebauche de mouvements d'ensemble circulaires |
| 3 | Mouvements d'ensemble : cercles centrés sur eux-mêmes |
| 4 | Mouvements d'ensemble : vagues rondes en mouvement |
| 5 | Mouvements d'ensemble intensifiés |

ii. **Evaluation de la concentration des spermatozoïdes « La numération » :**

La numération est la détermination du **nombre de spermatozoïdes dans l'éjaculat**. Elle peut être effectuée par des méthodes automatisées réservées aux centres spécialisés ou par des méthodes manuelles.

ii.1 Méthode manuelle

Les méthodes manuelles sont rapides, simples et ne nécessitent pas beaucoup de matériel.

Le sperme est tout d'abord dilué dans un liquide hypertonique comme du chlorure de sodium à 3% qui immobilise les spermatozoïdes. Cette dilution est effectuée dans des mélangeurs de Potain utilisés habituellement pour le comptage des 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 fluide prostatique récoltée lors du prélèvement. (*Feldman et Nelson, 1987 ; Fontbonne et Dumont, 1992*).

ii.2 Méthode automatisée

- **Evaluation par utilisation d'un spectrophotomètre :**

La numération peut également être réalisée grâce à des techniques plus modernes telles que la spectrophotométrie. L'acquisition d'un spectrophotomètre (Figure 17) est justifiée pour les praticiens spécialisés ou les grands haras dans l'espèce équine, surtout quand l'insémination artificielle est utilisée. Cette technique mesure la densité optique d'un échantillon de sperme dilué et en détermine la concentration. L'estimation de la concentration en spermatozoïdes d'un éjaculat par mesure de la densité optique doit être considérée comme assez juste et utilisable en routine pour la préparation de doses d'insémination, mais pouvant être soumise à des biais de mesure (*Allimant 2010*).

Principe de la spectrophotométrie :

Un 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 : $A = \log (I_0/I)$.



Figure 17 - Spectrophotomètre AccuRead® (Cliché issu de chez IMV technologies).

- 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 de la semence réfrigérée ou encore congelée/décongelée (Pe a Mar nez 2004, Rijsselaere et al. 2005; Allimant 2010). Actuellement, de nombreux systèmes CASA sont disponibles pour l'évaluation de la mobilité des spermatozoïdes dans les espèces canine et féline. La principale (figure 18):

Le système Hamilton-Thorne : il s'agit d'un analyseur d'image comprenant un éclairage stroboscopique par illumination de diode pour produire des images nettes et plus précises, un système d'enregistrement pour favoriser le suivi de l'analyse du sperme, une classification automatisée des mouvements des spermatozoïdes 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 18 - CASA IVOS II (cliché issu de chez IMV technologies).

Littérature :

Il y a eu des travaux similaires à notre étude qui consiste à comparer les différentes techniques d'évaluation de la concentration spermatique mais chez d'autres espèces, comme exemple le mémoire de Fin de Cycle En vue de l'obtention du diplôme MASTER en Bio-ressource animale et Biologie intégrative de l'Université Abderrahmane MIRA – Bejaia. Dont le thème était l'Etude comparative de quelques méthodes d'analyse de la qualité du sperme bovin de l'année 2017.

Par contre notre Etude Comparative Entre Trois Méthodes d'Evaluation de la Concentration spermatique chez le Chien n'a pas été abordé auparavant.

ETUDE EXPERIMENTALE

Evaluation de la qualité de la semence dans l'espèce canine par plusieurs méthodes

I. Contexte et lieu d'étude :

Notre projet de fin d'étude (2018/2019) a été réalisé à la **Plateforme Biotechnologique en Reproduction des Carnivores** de l'Université Saad Dahlab de Blida 1. Il s'agit d'un service commun de recherche organisé en quatre sections techniques en l'occurrence, section médecine chirurgie et reproduction, section banque de semences animales, section analyse microbiologique et génomique et section animalerie. La plateforme comprend les locaux techniques suivants :

- Une salle d'attente et une salle de consultation.
- Un laboratoire d'analyse de la semence (figure 22).
- Un laboratoire de congélation de semence (figure 19).
- Une banque de semence canine (figure 20).
- Une salle d'échographie et d'endoscopie (figure 21).
- Un bloc de chirurgie (figure 23).
- Une salle de production d'azote (figure 24) et enfin le magasin.



Figure 19- le laboratoire de congélation de semence.



Figure20- banque de semence de chez IMV technologie



Figure 21- l'échographe de chez IMV technologie.



Figure 22- laboratoire d'analyse de la semence.

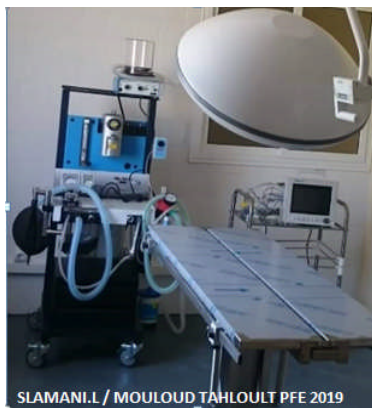


Figure 23- bloc de chirurgie.



Figure 24- salle de production d'azote.

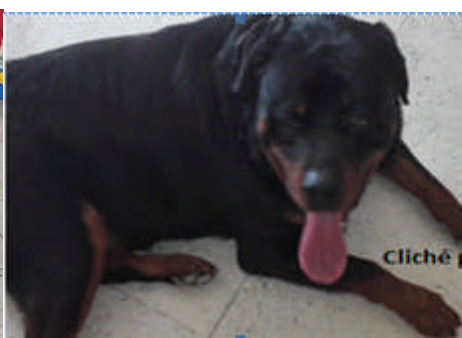


Figure 25 – les chiens qu'on a reçu (TIGRO, OSCAR, JUMPER).

Notre projet de fin d'étude consiste à comparer les différentes techniques d'analyses de la semence canine (à l'état frais et réfrigéré), telles que la spectrophotométrie et le système CASA (Computer Assisted Semen Analysis), tout en se basant sur la technique de référence qui est la

numération manuelle effectuée par L'hémocytomètre de Neubauer. Toutes ces techniques sont bien décrites dans la section matériels et méthode.

II. Les animaux administrés :

Nous avons accueilli 20 chiens (figure 25) et leurs propriétaires, mais le nombre d'éjaculat exploiter pour notre étude était de 8 éjaculats comme le montre le tableau n3, afin de les récoltés. La collecte du sperme est effectuée dans la salle de consultation. Le sperme est collecté par massage des bulbes érectiles, cette technique entraîne l'érection puis l'éjaculation. Le sperme est ensuite recueilli grâce à l'utilisation de cônes de prélèvement reliés à un tube plastique gradué et incassable. Tout le matériel destiné au prélèvement est propre (et rincé pour éviter toute action spermicide des savons ou détergents puis séché dans l'étuve (figure26). Les trois phases de la semence sont récoltées séparément.

Tableau 3- fiche de réception des chiens.

| <i>Propriétaires</i> | <i>Chiens</i> | <i>Race</i> | <i>Age</i> | <i>Date de la récolte</i> |
|----------------------|---------------|-----------------|---------------|---------------------------|
| Raouf Hamidi | TIGRO | Cani-corso | 8 ans et demi | 26/11/2018 |
| Sahar Soufiane | VETO | Beagle | 12 ans | 28/11/2018 |
| Sahar Soufiana | CESAR | Beagle | 11 ans | 28/11/2018 |
| Rachem Riad | OSCAR | Rottweiler | 3 ans | 05/03/2019 |
| Raouf Hamidi | JUMPER | Bergé allemand | 17 mois | 12/03/2019 |
| Kaci – chaouche | MATRICE | Troteur anglais | 2 ans | 04/03/2019 |
| Zerouel | TARSON | Bergé allemand | 7 ans | 12/03/2019 |
| Aissa | LEON | Rottweiler | 2 ans | 12/03/2019 |
| Mouloud Hamza | BAG | Rottweiler | 2 ans et demi | 11/04/2019 |



Figure 26 – l'étuve du laboratoire.

III. Matériels et méthodes :

Une fois que le sperme est récolté on passe dans le laboratoire d'analyse, en premier lieu on sépare la fraction spermatique en deux aliquotes, dont un est laissé à l'état frais et l'autre mélangé à un diluant trouble à base de jaune d'œuf (semence réfrigérée).

Chacun des deux aliquotes a été réparti en cinq fractions évaluées, pour l'analyser en utilisant les trois techniques :

- 1- L'hémocytomètre de Neubauer amélioré.
- 2- Le photomètre Accuread®.
- 3- Le photomètre SDM1®.
- 4- CASA (HAMILTON THORN IVOS II).

A- L'hémocytomètre de Neubauer amélioré

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

Dans cette partie, nous présenterons en premier lieu les composantes et le fonctionnement de l'hémocytomètre, et en deuxième lieu nous décrirons les étapes d'utilisation du comptage de cellule avec un hémocytomètre pour obtenir des résultats fiables, tout ça en suivant : « Guide technique OMS 2010 ».

1- Plaque de Neubauer ou hémocytomètre :

L'hémocytomètre de Neubauer amélioré comporte deux chambres de comptage distinctes (figure 29), chacune présentant un motif microscopique de lignes de quadrillage de 3 mm x 3 mm 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 (Figure 27) (Guide de OMS 2010).

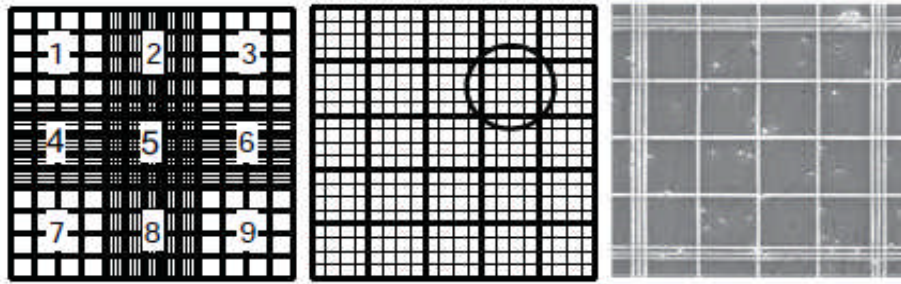


Figure 27. Hémocytomètre de Neubauer amélioré (Micrographie fournie par C Brazil).

Esquisses de la zone inscrite montrant: les neuf grilles dans une chambre de l'hémocytomètre (panneau de gauche) la grille centrale numéro 5 (la figure 27) 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 x 0,05mm. Avec une profondeur de 100 μ l, chaque grille contient 100 μ l. Quatre de ces grilles (1, 3, 7 et 9) contiennent quatre rangées de quatre carrés, chacune contient 6,25 μ l, deux grilles (2 et 8) contiennent quatre rangées de cinq carrés, chacune de 5 μ l, deux grilles (4 et 6) contiennent cinq rangées de quatre carrés. Chacune contient 5 μ l et la grille centrale (numéro 5) contient cinq rangées de cinq carrés (figure 28).

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).

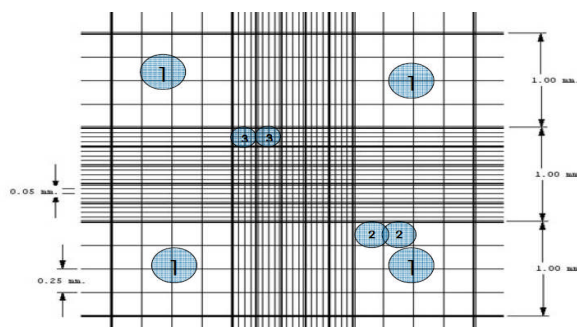


Figure 28- Détail de la grille de la plaque de Neubauer.



Figure 29 - photo de la cellule de Neubauer.

2- Matériels :

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

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



Figure 30 - Matériels nécessaire pour le comptage des cellules.

3- Comptage des cellules étapes par étapes : d'après le guide de l'OMS 2010.

ETAPE 1 : Préparation de l'échantillon.

Selon le type d'échantillon à mesurer, il faudra préparer un échantillon avec une concentration adéquate pour le comptage. Typiquement, la gamme de concentrations qui permet le comptage d'hémocytomètre se situe entre 250 000 et 2,5 millions de cellules par 1ml de cellules.

- On prépare on premier lieu un diluant hypertonique (NaCl à 4%), on prend 4g de NaCl et on ajoute de l'eau déminéraliser, jusqu'à l'obtention d'un volume de 100ml.
Et on mélange à l'aide du Vortex pendant 20min à grande vitesse (figure 31).



Figure 31 – Les étapes de préparation du diluant (NaCl à 4%).

- Dans le laboratoire on réalise une dilution de (1/100^{ème}), à l'aide du diluant déjà préparé on prend 40µl de semence et on ajoute 3960µl de NaCl à 4%.
- On mélange la solution à l'aide du Vortex, à une vitesse de 20Hertz, pendant 10s. (Figure 32).



Figure 32 - homogénéisation de la solution à l'aide d'un vortex.

Etape 2 : Introduction de l'échantillon dans la plaque 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 Introduit une pointe jetable à l'extrémité de la micropipette.
- 2- On Mélange soigneusement la suspension, on la faisant tourbillonner pendant 10 secondes à la vitesse maximale (Figure 33).



Figure 33 – homogénéisation de la suspension pendant 10 secondes.

- 3- On ajuste la micropipette pour aspirer 10 µL de liquide immédiatement pour éviter la sédimentation des spermatozoïdes. Généralement cet ajustement se réalise en guidant le bouton du piston pour sélectionner le volume souhaité.

- 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 plaque 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 pendant que vous vérifiez que le liquide entre correctement et de manière uniforme dans la plaque (Figure 34).



Figure 34 – Remplissage de la plaque de Neubauer.

- 8- Si des bulles apparaissent, ou le couvre-objet a bougé ou toute autre anomalie, on répète l'opération.
- 9- On mélange la deuxième dilution pour la deuxième chambre comme ci-dessus, et on retire immédiatement un deuxième 10 μ l de l'aliquote. Et on charge la deuxième chambre de l'hémocytomètre en suivant les étapes déjà cités.
- 10- On stocke l'hémocytomètre horizontalement pendant au moins 15 minutes à la température ambiante dans une chambre humide (par exemple sur du papier filtre saturé d'eau dans une boîte de Pétri couverte) pour éviter le dessèchement. Les cellules immobilisées vont sédimenter sur la grille pendant ce temps. (figure 35).



Figure 35 – Les deux cellules de Neubauer dans des chambres humides.

ETAPE 3 : Préparation et réglage du microscope.

- On met la plaque de Neubauer dans le plateau du microscope (Figure 36).
- On règle le microscope jusqu'à ce qu'on voie nettement les spermatozoïdes on regardant par la binoculaire, à un grossissement x400.
- On Cherche le premier cadre où on va réaliser le comptage. Pour cet exemple, nous allons compter le grand carré central de la plaque de Neubauer.



Figure 36- 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'hémocytomètre. 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 4) (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 noir. 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 37) (Guide d'OMS 2010).

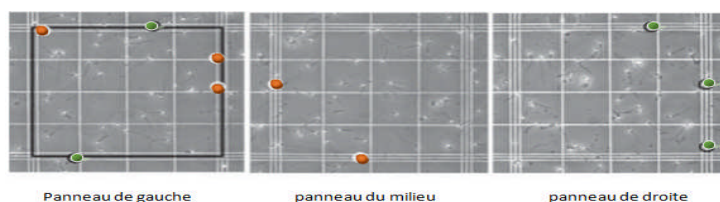


Figure 37 - Les spermatozoïdes à compter (Micrographies fournies par C Brazil).

ETAPE 5 : Calcul de la concentration

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

Tableau 4- Différences acceptables entre deux comptes de réplication pour une somme donnée sur la base de l'intervalle de confiance arrondi à 95%.

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

4- Entretien de la chambre de comptage :

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

B- Le photomètre ACCUREAD

1- Définition :

Ce photomètre est un petit instrument facile à utiliser qui est dédié à la mesure de la concentration des spermatozoïdes en suspension à 595 nm. (Figure40).

La mesure est obtenue grâce à l'association d'une source lumineuse **DEL** à 595 nm et d'une fibre optique conduisant le signal lumineux jusqu'au détecteur. Ce système s'avère plus fiable et plus reproductible qu'un système colorimétrique basé sur l'utilisation d'une lampe tungstène et d'un filtre de longueur d'onde. L'utilisation d'une **DEL** émettrice à 600 nm assure une parfaite répétabilité de la longueur d'onde sans besoin de recalibrage dans le temps. L'instrument peut être relié, via un câble série, à une imprimante série pour l'obtention d'une copie imprimée ou à un PC pour le téléchargement des résultats dans un tableur (notice d'utilisation de l'ACCUREAD®).



Figure 40 - Photomètre ACCUREAD.

2- Matériel utilisé : (figure 41).

- a) Le photomètre ACCUREAD®.
- b) Les cuvettes.
- c) Les micropipettes.
- d) Le parafilm.
- e) La solution NaCl à 0.9%.
- f) Les embouts pour micropipettes

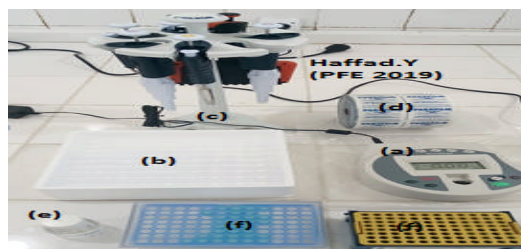


Figure 41 - le matériel utiliser pour effectuer une mesure au photomètre ACCUREAD.

3- Méthode de travail :

- **Taux de dilution** : le taux de dilution retenu dans le tableau 5, selon les caractéristiques de notre photomètre (notice d'utilisation de l'ACCUREAD®) est :

Tableau 5 - taux de dilution de la semence canine pour exécution d'une mesure au photomètre ACCUREAD.





| Espèce | Volume de sperme pur | Volume de NaCl à 0.9% ou milieu pour l'espèce porcine | Taux de dilution | Plage de concentration |
|--------|----------------------|---|----------------------|---|
| Canin | 40µl | 3960µl | 1/100 ^{ème} | 500.10 ⁶ à 2,5.10 ⁹ /ml |

- **Exécution d'une mesure** :

À noter que le faisceau lumineux est dirigé de l'avant vers l'arrière à travers la cuvette échantillon, assurez-vous que celle-ci est insérée dans l'alignement correct du sorte que les faces claires orientées d'avant en arrière (figure 42).



Figure 42 - les étapes d'exécution d'une mesure au photomètre ACCUREAD.

1. On met l'instrument en marche en appuyant sur le bouton "Marche/Arrêt": .
2. On vérifie qu'on est en mode concentration par la présence du symbole  à gauche de l'écran. Si ce n'est pas le cas, on appuie successivement sur la touche "Mode" jusqu'à l'affichage du symbole .
3. On place la cuvette zéro dans la chambre à échantillons (cuvette contenant uniquement du NaCl à 0,9%).
4. On appuie et on relâche la touche "Zéro"  . 0.00 apparaît sur l'écran.
5. On enlève la cuvette Zéro et on la remplace par l'échantillon de semence d'un volume de 40 µl préalablement diluée dans un volume de NaCl à 0,9 % 3960 µl pour l'espèce canine.
6. On homogénéise deux fois la cuvette par retournement entre le pouce et l'index (cuvette fermée par du parafilm).

7. On appuie et on relâche le bouton "Measure" . L'affichage indique la concentration en millions (06) ou en milliards (09) par ml. Pour afficher successivement l'absorbance ou le % de transmission, appuyer sur la touche Mode. .

Plusieurs échantillons peuvent être lus successivement. Il est recommandé de refaire le zéro toutes les 10 à 15 minutes pour éviter une lente dérive de l'instrument. En cas de doute, refaire toujours le zéro.

4- Résultat :

- **Lecture :**

Les valeurs lues au photomètre en fonction de l'équation proposée (figure43), correspondent donc à des valeurs moyennes de concentration par rapport à une population donnée dans des conditions d'utilisations précises.

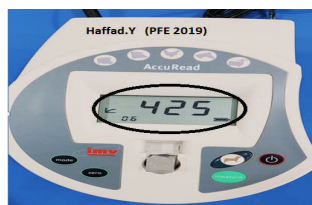


Figure 43 - lecture sur photomètre ACCUREAD.

- **Causes d'erreurs :**

Il est tout à fait possible que des mesures sortent de l'intervalle de confiance et qu'elles soient aberrantes si les caractéristiques de l'éjaculat ne correspondent pas à la moyenne de ceux utilisé pour l'étalonnage (présence de sang, d'urine, de tapioca ou de tout autre cops étranger dans le sperme: modification de la composition du plasma séminal...etc.) (Notice d'utilisation de l'ACCUREAD®).

Attention :

Il est important d'utiliser, en routine, la même solution que celle qui a été utilisée pour le paramétrage soit du Na Cl à 0.9% et de ne pas la conservée plus d'une semaine une fois quelle est entamée. (Notice d'utilisation de l'ACCUREAD®).

5- Nettoyage et entretien général de l'appareil:

L'instrument ne comporte pas de pièces susceptibles de s'user. (Notice d'utilisation de l'ACCUREAD®).

L'instrument nécessite peu d'entretien. Les mesures suivantes sont considérées comme une

bonne pratique :

1. Gardez l'instrument en bon état de propreté et sec.
2. Essuyez immédiatement tout liquide épanché.
3. Nettoyez avec un chiffon légèrement humide, un savon ou détergent non abrasif à base d'eau.
4. L'instrument doit être essuyé.
5. Enlevez les cuvettes de l'instrument lorsqu'il n'est pas utilisé.
6. Rangez l'instrument dans un emplacement à distance des produits chimiques ou des émanations corrosives.

C- Le photomètre SDM1

1- Définition :

Le photomètre SDM1 a été spécialement conçu pour mesurer la densité du sperme des animaux domestiques (figure44). La turbidité (état d'un liquide trouble) est mesurée avec un filtre de 546 nm. L'appareil réalise automatiquement une remise à zéro. Pour cette raison, vous ne devrez que très rarement le recalibrer. (Notice d'utilisation de SDM1).

La mesure de la densité du sperme s'effectue sur un échantillon de semence non diluée. Le résultat est indiqué en millions de cellules spermatiques par millilitre.

Les mesures sont dépendantes de l'espèce et sont exactes avec une précision d'environ 90% dans la gamme suivante:

| | |
|-------|--------------------------|
| Chien | $150.10^6 - 500.10^6/ml$ |
|-------|--------------------------|

La mesure photométrique d'une concentration de sperme est une méthode de mesure indirecte. Le photomètre mesure l'opacité d'un échantillon liquide et calcule la concentration du sperme suivant une courbe programmé spécifiquement pour l'espèce canine. (Notice d'utilisation de SDM1).



Figure 44 - le photomètre SDM1.

2- Matériels utilisée : (figure45)

- (a) La cuvette de contrôle : La cuvette de contrôle est utilisée pour vérifier que la calibration soit correcte. La valeur de la calibration est indiquée sur la cuvette de contrôle (300+/-5 millions/ml).
- (b) La micro-cuvette : elle est conçue spécialement pour ce photomètre. Elle est fabriquée avec une grande précision. La longueur de son chemin optique est de 0.7 mm. Les microcuvettes servent à la fois de pipette, de tube à essai et de cuvette de mesure.
- (c) Le photomètre SDM1.
- (d) les micropipettes.
- (e) les embouts.

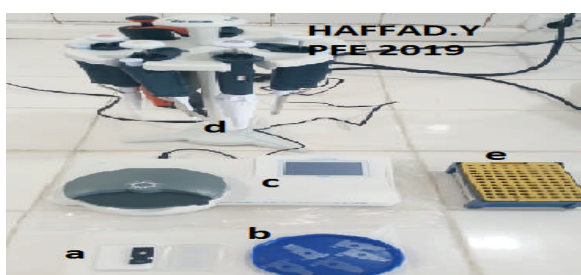


Figure 45 - le matériel utilisé pour effectuer une mesure au photomètre SDM1.

3- Méthode de travail :

- **Exécution d'une mesure** (figure 46) :

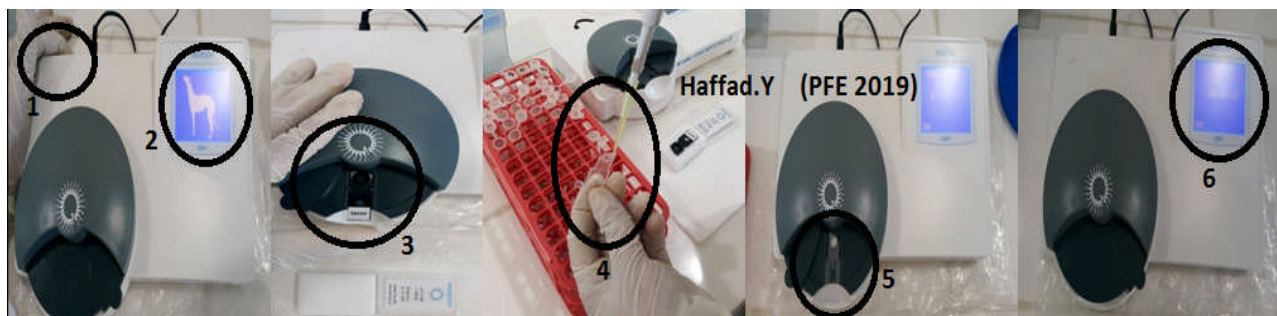


Figure 46 - les étapes d'exécution d'une mesure au photomètre SDM1.

1. On met en connexion le photomètre au courant avec le transformateur et l'allumé avec l'interrupteur situé à l'arrière. Le photomètre est alimenté en 12 V, via un transformateur qui se branche sur le secteur (115V ou 230V). L'appareil peut aussi fonctionner avec des piles (placée dans la partie inférieure de l'appareil).
2. Le numéro de version du logiciel, la date et le numéro de série s'affiche sur l'écran en premier lieu, puis l'espèce en deuxième lieu (l'espèce canine).

3. On insère la cuvette contrôle dans le porte-cuvettes et on effectue la mesure. La valeur affichée ne doit pas différer de +/-5 de la valeur de calibration. On effectue le contrôle avant le début du travail. S'il y a une différence de plus de +/-5, veuillez contacter la société Minutube (fabricant).
4. On remplit une micro-cuvette, on la maintient verticalement et on immerge son extrémité dans le récipient de semence non diluée. On attend jusqu'à ce qu'elle soit entièrement remplie par capillarité. On évite d'immerger complètement la cuvette; il ne doit y avoir aucune bulle d'air dans l'échantillon. Il est aussi possible de se servir d'une pipette pour remplir la cuvette.
5. On pose la cuvette remplie dans la cavité prévue du porte-cuvette rond.
6. On tourne le porte-cuvette vers la droite et la mesure s'effectue automatiquement.

Mode veille :

Après 30 secondes d'inactivité le rétro éclairage s'éteint et l'appareil est en mode veille. En tournant le porte-cuvettes, le photomètre est activé de nouveau. Pendant le mode veille le rétro-éclairage LCD clignote dans un intervalle de 3 secondes indiquant que l'appareil est toujours allumé. (Notice d'utilisation de SDM1).

4- Résultat :

- Lecture :

Le mesurage démarre automatiquement. Le résultat apparaît sur l'écran après quelques secondes. La densité spermatique est indiquée en millions par millilitre ou en milliards par millilitre.

- Causes d'erreurs :

Le résultat final pourra être influencé par tout facteur qui perturbe l'opacité. Toute décoloration du sperme, des diluants non transparents, des salissures dans la source lumineuse du photomètre ou de la micro-cuvette peuvent entraîner une aléatoire du résultat.

En cas de nécessité de dilution d'un échantillon de sperme: une dilution non précise ou l'utilisation non précise d'une pipette peuvent être la raison pour des valeurs de concentration incorrectes. L'échantillon de sperme prélevé doit être représentatif de la semence prélevée. Une homogénéisation de la semence avant le prélèvement est très importante, car les spermatozoïdes

se déposent rapidement.

Le photomètre, surtout la partie optique, ainsi que la micro cuvette récipent, doivent être tenu propre, sans salissures ou poussière (Notice d'utilisation de SDM1).

5- Nettoyage et entretien général de l'appareil :

Le couvercle rond au-dessus de l'unité de mesure du photomètre est fixé par un aimant; il peut être facilement retiré.

Le porte-cuvette situé en dessous peut être retiré en le tournant pour son nettoyage.

L'optique peut alors être nettoyée avec un coton-tige imbibé d'alcool. (Notice d'utilisation de SDM1).

Attention: N'utilisez pas d'objets coupants ou pointus. Si nécessaire, nettoyez le porte-cuvette.

D- CASA (HAMILTON THORN IVOS II)

Le système d'analyse automatisée CASA est actuellement en place dans plusieurs laboratoires de référence afin d'estimer objectivement les caractéristiques de mouvement des spermatozoïdes. Il permet de visualiser et de numériser des images successives, de traiter et d'analyser les données et de fournir ensuite des informations exactes, précises et significatives sur la cinématique de cellules individuelles permettant d'apporter des données statistiques sur la population moyenne de cellules.

1- Définition :

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 mouvements (figure 47).

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 de spermatozoïdes fléchant (dont la trajectoire a des caractéristiques supérieures à une vitesse et une linéarité de mouvement prédéfinie)

- l'amplitude de mouvements latéraux de la tête des spermatozoïdes pendant leur déplacement **ALH**.
- la vitesse moyenne de déplacement linéaire **VSL**.
- la vitesse curviligne **VCL**. C'est-à-dire la vitesse mesurée sur la distance totale parcourue
- la fréquence des rythmes de croisements des trajectoires **BCF**.
- la moyenne des déplacements angulaires **MAD**.
- La concentration.

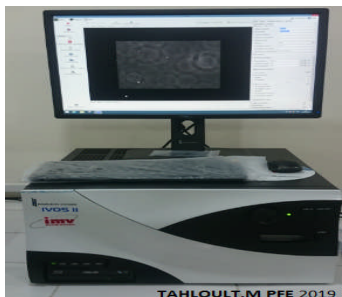


Figure 47 – HAMILTON THORN IVOS II.

2- **Matériel utilisé** : (figure 48)

- 1) Micropipettes.
- 2) Diluants (à base de jaune d'œuf, Easy Buffer, canixcell, Na Cl).
- 3) Le système d'analyse de la semence assisté pas ordinateur CASA (HAMELTON THON IVOS II).
- 4) Eppendorf.
- 5) La lame de comptage « Leja » : c'est une lame à comptage et à usage unique constitue la solution la plus fiable, la plus rapide et la plus précise.
- 6) Un échantillon de la semence.
- 7) Vortex.
- 8) Portoir.
- 9) Aimant.
- 10) Bicher gradué.
- 11) L'embout.

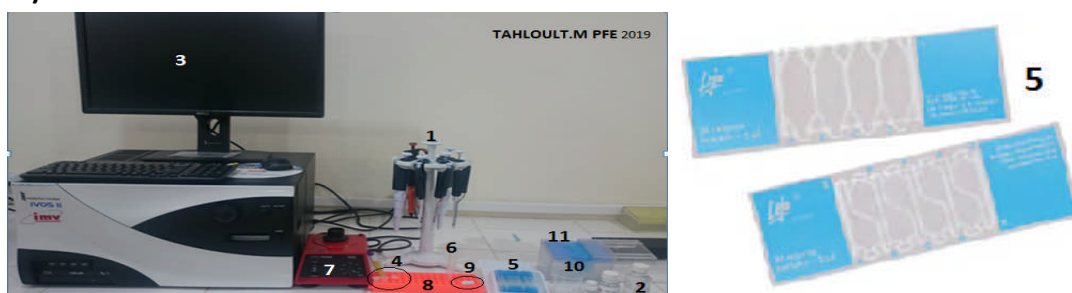


Figure 48- Le matériel utilisé pour faire une évaluation à l'aide du CASA.

3- Méthode de travail :

- La dilution :

Le but de la dilution est de diminué la concentration de la semence en SPZ pour que le CASA puisse mesurer. La concentration doit être au alentour de 25×10^6 SPZ/ml.

a) Etapes de dilution : (figure 49)

- ✓ Rapidement après la récolte on mesure la concentration par un photomètre.
- ✓ On calcule le facteur de dilution.
- ✓ on vortex la semence pendant 10s.
- ✓ A l'aide d'une micropipette on prend 40 μ l de sperme et on le met dans un Eppendorf.
- ✓ On ajoute 40 x FD μ l de diluant.

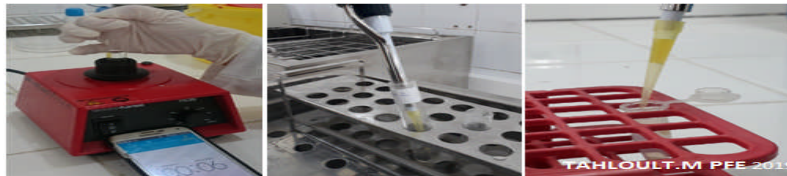


Figure 49 - Les étapes pour diluer la semence.

b) Types de diluants :

On a utilisé trois types de dilutions:

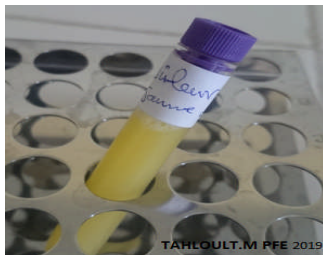
1. **Easy Buffer** : il permet de réduire la concentration en SPZ toute en gardant leur vitalité.



2. **Na Cl a 4%** : le but de cette dilution est réduire la concentration de la semence en SPZ et également immobiliser les SPZ pour voire la différence entre les résultats lorsque les SPZ sont mobile (dilution avec Easy Buffer) et lorsqu'ils sont immobile.



- 3. Diluant à base de Jaune d'œuf :** le but de la dilution avec le jaune d'œuf est d'obtenir une semence prête à être conservé (réfrigérée). donc la concentration en SPZ doit être 100×10^6 spz/ml.



i. Préparation du diluant à base de jaune d'œuf : (figure 50)

- On casse un œuf de moins de 24h et on sépare le jaune du blanc.
- On met 4ml de canixcell dans un bicher.
- A l'aide d'une micropipette on ajoute 1ml de jaune d'œuf.
- Puis on met un aiment et on mélange pendant 20 minutes.
- Et enfin on filtre le tous et on obtient un diluant à base de jaune d'œuf.

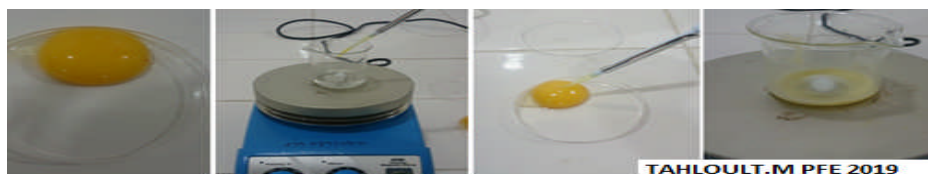


Figure 50 – Les étapes de préparation du diluant à base du jaune d'œuf.

ii. La dilution :

Premièrement on va diluer par le diluant a base de jaune d'œuf pour qu'on obtient une concentration de 100×10^6 SPZ/ml, mais avec cette concentration on ne peut pas mesurer par le CASA, donc on est obligé de faire une deuxième dilution par Easy Buffer : On met dans un Eppendorf 120µl de Easy Buffer et on ajoute 40µl de semence déjà diluer dans le jaune d'œuf après l'avoir tourbillonner pendant 10s.

Remplissage de la chambre de comptage :

On a devant nous deux échantillons dans l'un est diluer avec du jaune d'œuf et l'autre sans jaune d'œuf (Figure 51).

- a) Appuis sur le bouton load pour sortir porte lame (plage slot).
- b) Placer la lame et la fixer.
- c) Tourbillonner l'échantillon pendant 10s.

- d) A l'aide d'une micropipette aspirer un petit volume 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.
- g) Remplir deux chambres par semence avec jaune d'œuf et les deux autres avec semence sans jaune d'œuf.
- h) Appuis de nouveau sur le bouton load pour chargé la lame.

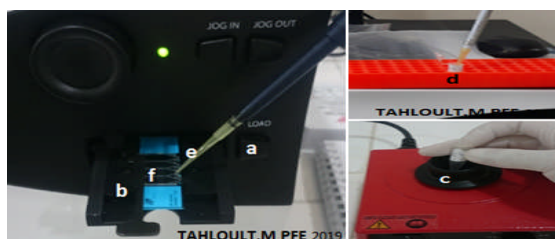


Figure 51 – Les étapes de remplissage de la lame Leja.

4- Mesure :

1. Faire la mise en point.
2. Saisir toutes les informations : espèce animal, le nom du chien, lignée génétique, numéro de l'éjaculat, le volume, le milieu, et le technicien de collecte (Figure 52).
3. Régler le nombre des captures (8 captures).
4. Cliqué sur capture auto.
5. Dans quelques secondes tous les résultats seront donnés (figure 53).
6. Cliqué sur enregistrer et effacer.
7. Et enfin décharger la lame et la jeter dans la poubelle.

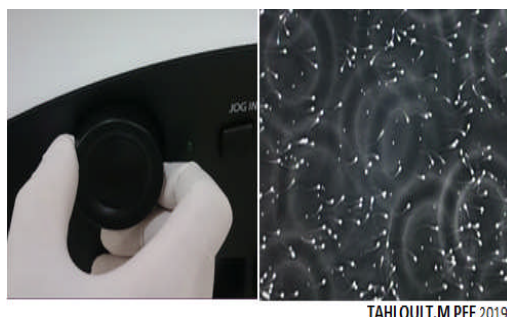


Figure 52- la mise en point de l'échantillon.

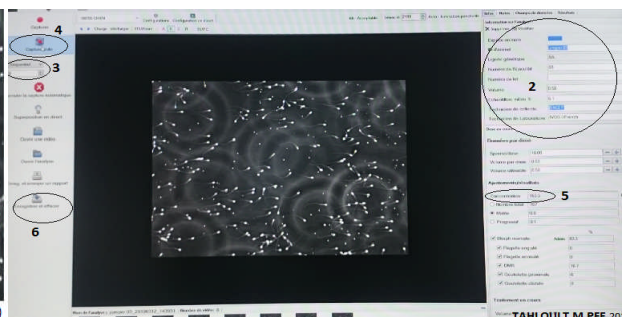


Figure 53 - les étapes de mesure par le CASA.

IV. Résultats et discussion:

A. Résultats d'étude de la semence fraîche :

a. Les résultats de l'évaluation de la concentration dans le sperme frais:

Les résultats de l'analyse de la semence à l'état frais avec les différentes techniques d'analyses son récapituler dans le tableau 6 :

Tableau 6 - les résultats obtenus avec les déférentes techniques d'évaluation de la semence à l'état frais (SPZ/ml).

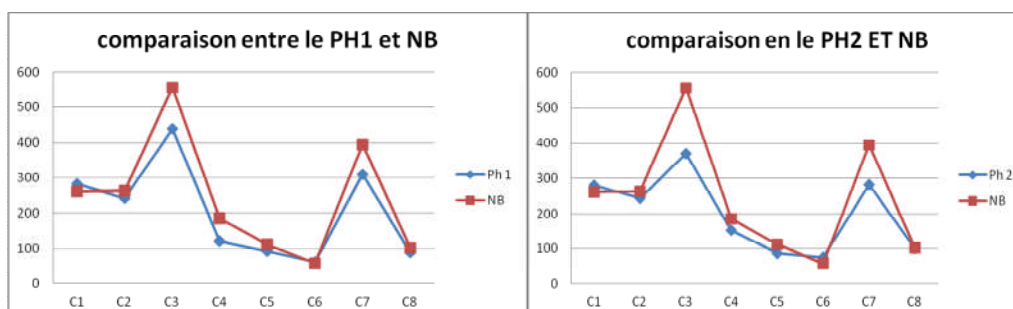
| chiens | NB | Ph 1 | Ph 2 | CASA 1 | CASA 2 |
|--------|--------------------------|------------------------|-----------------------|--------------------------|--------------------------|
| C1 | 260 x 10 ⁶ | 283 x 10 ⁶ | 281 x 10 ⁶ | 113 x 10 ⁶ | 216 x 10 ⁶ |
| C2 | 262 x 10 ⁶ | 241 x 10 ⁶ | 243 x 10 ⁶ | 185 x 10 ⁶ | 233 x 10 ⁶ |
| C3 | 557,5 x 10 ⁶ | 438 x 10 ⁶ | 370 x 10 ⁶ | 285 x 10 ⁶ | 565 x 10 ⁶ |
| C4 | 185 x 10 ⁶ | 122 x 10 ⁶ | 153 x 10 ⁶ | 91,71 x 10 ⁶ | 163 x 10 ⁶ |
| C5 | 111,81 x 10 ⁶ | 92,2 x 10 ⁶ | 86 x 10 ⁶ | 85,1 x 10 ⁶ | 99,38 x 10 ⁶ |
| C6 | 57,22 x 10 ⁶ | 61 x 10 ⁶ | 75 x 10 ⁶ | 48,84 x 10 ⁶ | 58,98 x 10 ⁶ |
| C7 | 395 x 10 ⁶ | 310 x 10 ⁶ | 282 x 10 ⁶ | 256,86 x 10 ⁶ | 429,62 x 10 ⁶ |
| C8 | 102,5 x 10 ⁶ | 88 x 10 ⁶ | 101 x 10 ⁶ | 67,76 x 10 ⁶ | 86,41 x 10 ⁶ |

Légende :

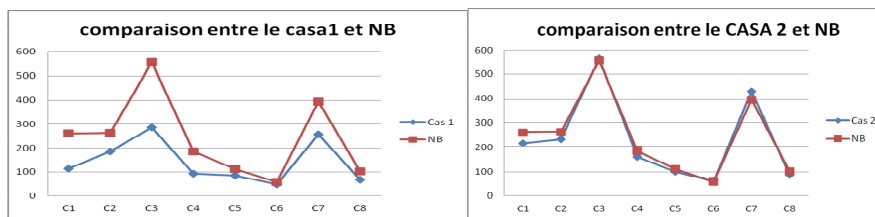
| | |
|---------------|--------------------------------|
| F | Semence fraîche |
| R | Semence réfrigérée |
| Ph1 | Photomètre Accured® |
| Ph2 | Photomètre SDM1® |
| CASA 1 | CASA avec dilution Easy buffer |
| CASA 2 | CASA avec dilution NAACL 4* |
| NB | Hémocytomètre de Neubauer |

b. La comparaison entre les différentes techniques d'évaluation de la concentration dans le sperme frais:

- 1- Comparaison entre les deux photomètres (1 : Accuread® / 2 : SDM1®) et la cellule de Neubauer :



2- Comparaison entre le CASA (1 : les SPZ mobile/2 : les SPZ immobile) et la cellule de Neubauer :



c. Résultats de l'analyse de variance (ANOVA) sur sperme frais :

Remarque :
 Les valeurs de P sont :

- $P \geq 0,05$ —————> valeur non significative.
- $P = 0,05$ —————> valeur significative.
- $P \leq 0,05$ —————> valeur significative.
- $0,001 \leq P \leq 0,05$ —————> valeur très significative.
- $P \leq 0,001$ —————> valeur hautement significative.

Tableau 7 - résultats et interprétation des ANOVA sur sperme frais.

| Comparaison entre | La p-value | Interprétation |
|-------------------|--------------|---------------------------------------|
| NB – PH 1 | 0,708 | Différence non significative . |
| NB – PH2 | 0,743 | Différence non significative . |
| NB -- CASA 1 | 0,184 | Différence non significative. |
| NB – CASA 2 | 0,855 | Différence non significative . |
| CASA 1 – CASA 2 | 0,264 | Différence non significative . |

Les résultats statistiques d'une semence à l'état frais, évaluée par les deux photomètres (Accuread®. SDM1®), montrent des valeurs proches de celles de la technique de référence (NB), avec une **p-value** de **0,70** pour le Ph 1 et **0,74** pour le Ph 2.

Les résultats statistiques de la comparaison entre le CASA 2 et la NB donnent une différence non significative, mais une valeur très proche de celle de NB car la valeur de **P** est de **0,85** (proche à 1).

Cela montre que le sperme étant immobile aide le CASA à donner des résultats plus fiable à l'état frais.

B. Résultats d'étude de la semence réfrigérée :

a. Les résultats de l'évaluation de la concentration dans le sperme réfrigéré:

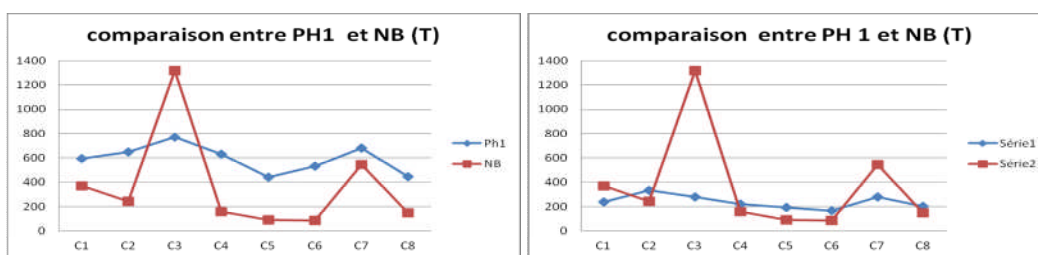
Les résultats de l'analyse de la semence diluer dans un diluant trouble (à base de jaune d'œuf).
Son récapitulé dans le tableau 8 :

Tableau 8 - les résultats obtenus avec les déférentes techniques d'évaluations de la semence diluer dans un diluant trouble. SPZ/ml

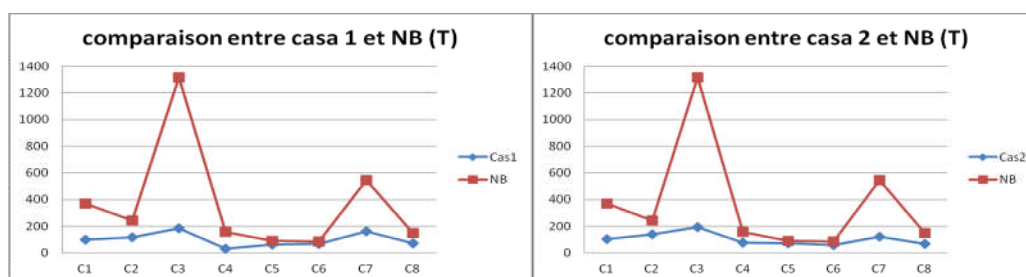
| chiens | NB | Ph 1 | Ph 2 | CASA 1 | CASA 2 |
|--------|--------------------------|-----------------------|-----------------------|--------------------------|--------------------------|
| C1 | 369,76 x 10 ⁶ | 593 x 10 ⁶ | 238 x 10 ⁶ | 99,1 x 10 ⁶ | 103,27 x 10 ⁶ |
| C2 | 243,99 x 10 ⁶ | 651 x 10 ⁶ | 333 x 10 ⁶ | 115,99 x 10 ⁶ | 141,05 x 10 ⁶ |
| C3 | 1315 x 10 ⁶ | 771 x 10 ⁶ | 281 x 10 ⁶ | 186,19 x 10 ⁶ | 192,49 x 10 ⁶ |
| C4 | 158 x 10 ⁶ | 629 x 10 ⁶ | 220 x 10 ⁶ | 29,14 x 10 ⁶ | 75,63 x 10 ⁶ |
| C5 | 90,8 x 10 ⁶ | 442 x 10 ⁶ | 192 x 10 ⁶ | 64,41 x 10 ⁶ | 69,36 x 10 ⁶ |
| C6 | 86,74 x 10 ⁶ | 534 x 10 ⁶ | 165 x 10 ⁶ | 65,28 x 10 ⁶ | 56,1 x 10 ⁶ |
| C7 | 547,5 x 10 ⁶ | 682 x 10 ⁶ | 280 x 10 ⁶ | 162,43 x 10 ⁶ | 122,11 x 10 ⁶ |
| C8 | 146,32 x 10 ⁶ | 444 x 10 ⁶ | 201 x 10 ⁶ | 70,23 x 10 ⁶ | 66,15 x 10 ⁶ |

b. La comparaison entre les différentes techniques d'évaluation de la concentration dans le sperme réfrigéré :

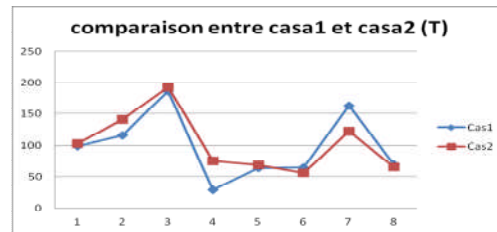
- 1- Comparaison entre les deux photomètres (1 : Accuread®/ 2 : SDM1®) et la cellule de Neubauer :



- 2- Comparaison entre le CASA (1: les SPZ mobile/2: les SPZ immobile) et la cellule de Neubauer dans un milieu trouble :



3- Comparaison entre le CASA 1 et le CASA 2 dans un milieu trouble :



c. Résultats de l'analyse de variance (ANOVA) sur le sperme réfrigéré :

Tableau 9 - les résultats des ANOVA de la semence réfrigérée.

| Comparaison entre | La p-value | Interprétation |
|-------------------|--------------|--|
| NB – PH 1 | 0,022 | Différence significative. |
| NB – PH2 | 0,818 | Différence non significative. |
| PH 1 – PH2 | 0,000 | Différence hautement significative. |
| NB -- CASA 1 | 0,010 | Différence très significative. |
| NB – CASA 2 | 0,012 | Différence très significative. |
| CASA 1 – CASA 2 | 0,668 | Différence non significative. |

Les résultats statistiques d'une semence diluée dans un diluant trouble à base de jaune d'œuf, évaluée par le photomètre Accuread®, donnent une différence significative avec une **p-value** de 0,02.

Cela montre que dans un milieu trouble, l'Accuread® n'arrive pas à évaluer correctement la concentration de la semence, car probablement la présence des débris ainsi que l'opalescence de l'échantillon interfère avec son fonctionnement ce qui a donné une hausse de valeurs.

Par contre les résultats statistiques obtenus par le photomètre SDM1®, donnent une différence non significative, avec une valeur très proche de celle de la NB ($p=0,818$), ce qui montre que le diluant trouble n'influence pas le fonctionnement du SDM1®.

La comparaison directe entre les deux photomètres a montré une différence hautement significative ($p=0,000$), ce qui confirme que l'un des deux (SDM1®) est plus proche de la technique de référence (NB). Ceci pourrait s'expliquer entre autre par le fait que l'Accuread® contrairement au SDM1 est conditionné par une dilution ($1/100^e$) préalable de l'échantillon ce qui pourrait représenter des risques d'erreurs humaines et matérielles dans la mesure de la concentration tel que la précision et la manière de pipetage.

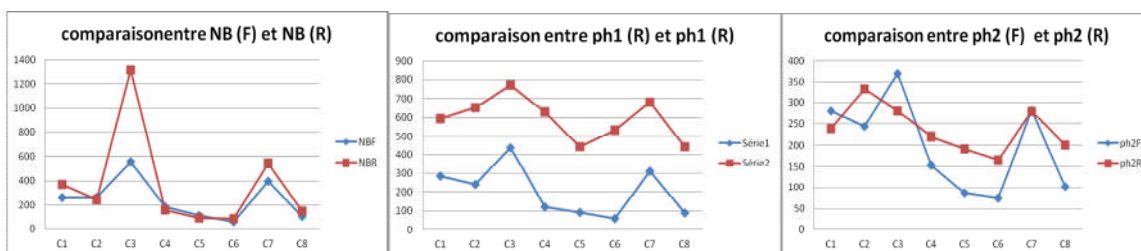
Les résultats statistiques d'une semence diluée dans un diluant trouble à base de jaune d'œuf, évaluée par le CASA 1 et CASA 2, ont donné des différences très significatives.

Ce qui montre que dans un milieu trouble le CASA n'arrive pas à évaluer correctement la concentration des SPZ (à l'état mobile ou immobile). Il sous-estime leur nombre.

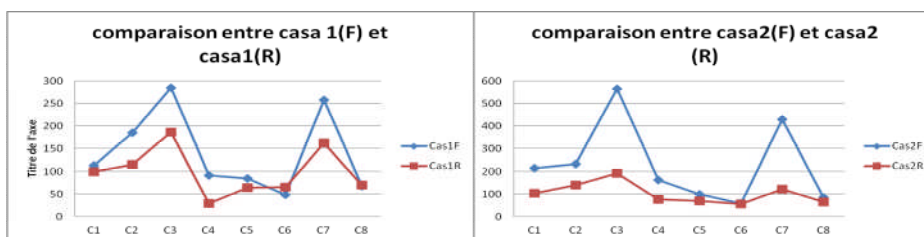
C. Résultats de l'étude comparative entre le sperme frais et réfrigéré :

a. La comparaison entre les différentes techniques d'évaluation de la concentration dans deux milieux différents :

1- Comparaison entre les deux cellules de Neubauer, entre deux photomètres Accuread® et deux photomètres SDM1® dans deux milieux différents (transparent et trouble) :



2- Comparaison entre les deux CASA 1 (SPZ : mobile) et entre les deux CASA 2 (SPZ : immobile) dans deux milieux différents (transparent et trouble) :



b. Résultats de l'analyse de variance (ANOVA) sur sperme frais et réfrigéré:

Tableau 10 – résultats des ANOVA de la comparaison entre la semence à l'état frais et réfrigérée.

| Comparaison entre | La p-value | Interprétation |
|--------------------------|---------------|--|
| NB (F) – NB (R). | 0,475 | Différence non significative. |
| PH1 (F) – PH1 (R). | 0,000 | Différence hautement significative. |
| PH 2 (F) – PH2 (R). | 0,167 | Différence non significative. |
| CASA 1 (F) -- CASA 1(R). | 0, 342 | Différence non significative. |
| CASA 2 (F) – CASA 2 (R). | 0,071 | Différence non significative. |

Les résultats statistiques de la comparaison des différentes techniques d'évaluation de la concentration de la semence entre les deux milieux ont donné une différence non significative à l'exception du photomètre Accuread® (hautement significative).

Ce résultat suggère que l'Accuread® contrairement au SDM1®, n'est pas fiable dans un milieu opalescent ce qui a été discuté dans les sections précédentes.

Pour la technique de référence (NB) ; il est évident qu'il n'y a pas de différence entre les deux situations car elle est basée sur la numération visuelle loin de toutes interférences du milieu opalescent.

Quand au système CASA, il semble qu'il reste fiable dans les deux situations et cela indépendamment de la mobilité et l'immobilité des SPZ ; ce qui pourrait signifier que cette mobilité spermatique dans une suspension trouble n'interfère pas de façon significative avec le fonctionnement du système dans l'évaluation de la concentration spermatique.

Finalement, il est important de noter que notre étude demeure entachée d'une insuffisance relative au nombre réduit de répétitions (n=8) ainsi qu'une faible homogénéité des données malgré les transformations effectuées ce qui limitent la fiabilité de nos analyses statistiques. Ce manque d'homogénéité est du dans notre cas à des valeurs de concentrations très éloignées les unes des autres.

Conclusion et recommandation

Les résultats de cette étude suggèrent ce qui suit :

- Dans le cas du sperme frais, les différentes techniques évaluées à savoir l'Accuread®, le SDM1 et le système CASA (HT-IVOS II) sont comparables à la technique de référence (La cellule de Neubauer) dans l'évaluation de la concentration spermatique chez le chien.
- Dans le cas du sperme dilué dans un milieu à base de jaune d'œuf, à l'exception de l'Accuread, toutes les techniques étudiées évaluent la concentration spermatique chez le chien de manière comparable à la technique de référence.
- La comparaison des différentes techniques d'évaluation entre l'état frais et le milieu trouble (opalescent) ont suggéré que :
 - la technique de référence (NB) est aussi bien fiable dans les deux situations.
 - l'Accuread® serait destiné plus au sperme frais que dilué dans un milieu trouble.
 - le SDM1 est fiable dans les deux situations.
 - le système CASA reste fiable dans les deux situations.

A l'issue de notre étude, nous **recommandons** ce qui suit :

- Refaire cette étude sur un effectif plus important (n=20).
- Veillez à la bonne homogénéité des données en évitant de travailler sur des valeurs avec des grands écarts.
- Intégrer la Cytométrie en flux (CMF) dans les techniques comparatives.

Bibliographie

ALLIMANT M. (2010)

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

BRIFFAUT Anne-Sophie, 2007. CONGELATION DE LA SEMENCE CANINE. Détermination de la combinaison optimale de quatre facteurs différents. Thèse
Pour obtenir le grade de Docteur Vétérinaire. UNIVERSITE CLAUDE-BERNARD - LYON I (Médecine - Pharmacie), 128p.

BARONE R. (1978)

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

BARONE R. (2001).

In : Anatomie comparée des mammifères domestiques. Tome 4. Vigot. 896p.

BEDFORD J.M., CROSS N.L. (1998)

Sperm Capacitation.

In : Knobil E., Neill J.D. (eds.). Encyclopedia of reproduction. Volume 4.
Academic press, San Diego, 597-602.

CABANNES Carole Rosine, 2008. COMPARAISON DES METHODES D'EVALUATION DE LA QUALITE
DE LA SEMENCE DANS LES ESPECES BOVINE, CANINE ET HUMAINE. Thèse pour obtenir le grade de
Docteur Vétérinaire. Université Paul-Sabatier de Toulouse, 107p.

COLLIN B. (2003).

Edition Derouaux Ordina, Liège, 562 pp.

DADOUNE J-P. et DEMOULIN A. (2001).

In : *La reproduction chez les mammifères et l'homme*. INRA Editions. Ellipses.

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

Appareil de reproduction masculin.

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

DACHEUX J-L. et DACHEUX F. (2001)

In : *La reproduction chez les mammifères et l'homme*. Nouvelle Edition entièrement refondue.
INRA Editions. Ellipses.

FONTBONNE A. (1991)

Contribution à l'étude de la congélation du sperme de chien : influence de la glycérolisation et de
la dilution.

Thèse de doctorat vétérinaire, Faculté de médecine de Créteil, Créteil, 210 pp.

FONTBONNE Alain et DUMON Christian (1992).
In : *Les indispensables de l'animal de compagnie. Reproduction du chien et du chat.*
P.M.C.A.C.Editions.

FONTBONNE A., DUMONT C. (1992)
Prélèvement et examen de la semence chez le chien.
In : Pages J.P. (eds.).*Les indispensables de l'animal de compagnie. Reproduction du chien et du chat.* PMCAC Edition, Paris, 251-260.

FONTBONNE A., BADINAND F. (1993)
Canine artificial insemination with frozen semen : comparison of intravaginal and intrauterine deposition of semen.
J. Reprod. Fert. Suppl., 47, 325-327.

FONTBONNE A., BADINAND F. (1993)
Studies on freezing dog spermatozoa : effect of glycerol on motility after thawing.
J. Reprod. Fert. Suppl., 47, 531-532.

FONTBONNE A. (1995)
Infécondité du chien mâle.
In : *Encyclopédie vétérinaire. Pathologie de la reproduction.* Elviesier, Paris, Volume 5, 1-13.

FONTBONNE A., BUFF S., GARNIER F. (2000)
Données récentes en physiologie et endocrinologie sexuelles dans l'espèce canine.
Le point vétérinaire, 31, 209, 27-32.

FRESHMAN J.L. (2002)
Semen collection and evaluation.
Clin. Tech. Small Anim. Pract., 17, 3, 104-107.

IMV TECHNOLOGIES, 2010. Manuel utilisateur PHOTOMETRE ACCUREAD, IFU-000113. 11p.

MARC. Stéphanie, 2015. ACTUALITES EN CRYOCONSERVATION DES SEMENCES DES PRINCIPALES ESPECES D'INTERET VETERINAIRE. Thèse pour obtenir le grade de Docteur Vétérinaire. UNIVERSITE CLAUDE-BERNARD - LYON I (Médecine - Pharmacie), 159p.

Ordre professionnel des technologistes médicaux du Québec, 2016. GUIDE SUR L'EXAMEN ET LA PRÉPARATION DE SPERME. 978-2-9814023-7-0, Dépôt légal - Bibliothèque et Archives nationales du Québec, Canada. 107p.

PENA A., LINDE-FORSBERG C. (2000)
Effects of spermatozoal concentration and post-thaw dilution rate on survival after thawing of dog spermatozoa.

Theriogenology, 54, 703-718.

REECE W.O. (1997)

Male reproduction.

In : Reece W.O. (eds.). Physiology of domestic animals. Second edition.

Williams and Wilkins Compagny, Baltimore, 344-365.

ROTA Ad., ROTA Al., MARTINI M., MILANI C., ROMAGNOLI S. (2005)

Evaluation of dog semen quality after slow (biological freezer) or rapid

(nitrogen vapours) freezing. *Reprod. Nutr. Dev.*, 45, 29-37.

ROTA A., MILANI C., ROMAGNOLI S. (2007)

Effect of post-thaw dilution with autologous prostatic fluid on dog semen

motility and sperm acrosome status. *Theriogenology*, 67, 520-525.

SMAHI Hayet et NASRI Hedjila, 2017. Etude comparative de quelques méthodes d'analyse de la qualité du sperme bovin. Mémoire de fin de cycle en vue de l'obtention du diplôme MASTER, spécialité Bio-ressource animale et Biologie intégrative. Université Abderrahmane MIRA-Bejaia, 39p.

TALON R. (1999)

Contribution à l'étude de la congélation du sperme de chien : étude des lésions de l'acrosome et de la membrane du spermatozoïde au cours des différentes étapes de la congélation.

Thèse de doctorat vétérinaire, Université Claude- Bernard, Lyon, 94 pp.

World Health Organization, 2010 (OMS 2010). WHO laboratory manual for the Examination and processing of human semen "FIFTH EDITION". 978 92 4 154778 9,

NLM classification: QY 190, 271p.