



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

Étude bibliographique
Évaluation de la qualité spermatique chez le lapin par le
logiciel CASA

Réalisé par

TOUATI Redha

Devant le jury :

Président	BOUKENAOUI N	Maitre de conférences A	ISV/USDB1
Examineur	EZZEROUG R	Maitre de conférences B	ISV/USDB1
Promoteur	LAGHOUATI A	Maitre Assistante B	ISV/USDB1

Année : 2021/2022

Remerciements

Je remercie vivement, ma promotrice M^{me} LAGHOUATI Amel, de m'avoir pris en charge, et pour sa disponibilité, son aide et ses précieux conseils.

Je tiens à remercier également les membres du jury

M^{me} BOUKENAOUI Nouria, de m'avoir fait l'honneur d'accepter la présidence du jury de ce mémoire. Hommage respectueux.

M^{me} EZZEROUG Rym, pour avoir accepté d'examiner ce travail. Sincères remerciements.

Ainsi que tout les membres de l'administration de l'institut des sciences vétérinaires de Blida pour leur bienveillance et leur disponibilité durant tout mon parcours universitaire.



Dédicace

Je dédie ce modeste travail à :

Mes très chers parents qui m'ont guidé durant les moments les plus pénibles de ce long chemin, ma mère « Zahia » qui a été à mes côtés et ma soutenue durant toute ma vie et a fait en sorte que je sois l'enfant model, et mon père « Ahmed » qui lui aussi a était présent pour moi et a sacrifié toute sa vie afin de me voir devenir l'homme que je suis aujourd'hui, merci d'avoir été là pour moi.

À ma Sœur bien aimée « Sonia », merci d'avoir été présente pour moi durant ce long chemin.

À mon frère décédé « Abdelkader », Tu nous manque énormément. Paix à ton âme.

À toute la famille « TOUATI »

À ma meilleure amie « Narimane Sekkai » merci d'avoir été à mes côtés.

À mes amis « Bilel, Saïd, Tahar, Hafidh, Walid, Farid, Madel, Islam, Tirigo, Ouizza et Hanane ».

Merci pour toutes ces belles années.

À toute personne ayant participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.



Résumé

L'analyse spermatique assistée par ordinateur (CASA) se fait une place dans les laboratoires de biotechnologies de la reproduction dans les élevages cynicoles.

Le système CASA (Computer-Aided Sperm Analysis) qui est une méthode semi-automatisée basée sur un principe consistant en la capture d'images au microscope puis le traitement de ces images permettant la détection des spermatozoïdes mobiles et immobiles grâce à une acquisition successive et rapide de plusieurs champs. En effet, le logiciel CASA est potentiellement un outil très puissant dans le domaine de la recherche et le domaine clinique. Son inclusion dans des études de toxicologie de la reproduction indique sa pertinence.

Ce travail vise à explorer les différents usages du logiciel CASA et son mode de fonctionnement notamment dans l'évaluation de la semence de lapin.

Les différents instruments CASA ont tous démontré des niveaux élevés de précision et de fiabilité en utilisant différentes méthodes de classification des spermatozoïdes. Leur disponibilité nous donne un excellent outil pour comparer objectivement la motilité, la concentration et la morphologie des spermatozoïdes et pour améliorer nos connaissances et notre capacité à les manipuler.

Ce dispositif peut être une alternative plus précise et reproductible à la méthode manuelle connue pour sa grande variabilité et son manque de standardisation

Mots clés : CASA, sperme, lapin, motilité, fertilité.

ملخص

يكتسب تحليل الحيوانات المنوية بمساعدة الكمبيوتر (CASA) مكاناً في مختبرات التكنولوجيا الحيوية الإيجابية في مزارع الأرناب.

نظام CASA (تحليل الحيوانات المنوية بمساعدة الكمبيوتر) وهو طريقة شبه آلية تعتمد على مبدأ يتكون من التقاط الصور تحت المجهر ثم معالجة هذه الصور مما يسمح باكتشاف الحيوانات المنوية المتحركة وغير المتحركة بفضل الاستحواذ المتتالي و سريع في عدة مجالات. في الواقع ، من المحتمل أن يكون برنامج CASA أداة قوية للغاية في مجال البحث والمجال السريري. يشير إدراجها في دراسات السموم الإيجابية إلى أهميتها.

يهدف هذا العمل إلى استكشاف الاستخدامات المختلفة لبرنامج CASA وطريقة تشغيله ، لا سيما في تقييم السائل المنوي للأرناب.

أظهرت جميع أدوات CASA المختلفة مستويات عالية من الدقة والموثوقية باستخدام طرق تصنيف الحيوانات المنوية المختلفة. يمنحنا توفرها أداة ممتازة للمقارنة الموضوعية بين حركية الحيوانات المنوية وتركيزها وتشكلها وتحسين معرفتنا وقدرتنا على التلاعب بها.

قد يكون هذا الجهاز بديلاً أكثر دقة وقابلية للتكرار للطريقة اليدوية المعروفة بتقلبها العالي وافتقارها للتوحيد القياسي.

الكلمات المفتاحية: CASA ، الحيوانات المنوية ، الأرناب ، الحركة ، الخصوبة.

Abstract

Computer-assisted sperm analysis (CASA) is gaining a place in reproductive biotechnology laboratories in rabbit farms.

The CASA system (Computer-Aided Sperm Analysis) which is a semi-automated method based on a principle consisting of the capture of images under a microscope then the processing of these images allowing the detection of mobile and immobile spermatozoa thanks to successive acquisition and fast of several fields. Indeed, the CASA software is potentially a very powerful tool in the field of research and the clinical field. Its inclusion in reproductive toxicology studies indicates its relevance.

This work aims to explore the different uses of the CASA software and its mode of operation, particularly in the evaluation of rabbit semen.

The various CASA instruments have all demonstrated high levels of accuracy and reliability using different sperm classification methods. Their availability gives us an excellent tool to objectively compare sperm motility, concentration and morphology and to improve our knowledge and ability to manipulate them.

This device may be a more accurate and reproducible alternative to the manual method known for its high variability and lack of standardization.

Keywords: CASA, sperm, rabbit, motility, fertility.

Sommaire

Introduction.....	1
1. Chapitre 1: Généralités anatomo-physiologiques sur l'appareil reproducteur mâle du lapin.....	4
1.1 Rappels anatomiques de l'appareil génital mâle du lapin :	4
1.1.1 Les testicules :	4
1.1.2 Les épидидymes :	5
1.1.3 Les canaux déférents :	5
1.1.4 Les glandes annexes :	5
1.1.5 Les voies externes d'excrétion et l'organe copulateur :	6
1.2 Physiologie de la production spermatique chez le lapin :	7
1.2.1 Puberté et maturité sexuelle :	7
1.2.2 Spermatogénèse :	7
2 Chapitre 2 : Sperme de lapin	10
2.1 La composition du sperme :	10
2.1.1 Les spermatozoïdes :	10
2.1.2 Le plasma séminal :	10
2.1.3 Le gel :	11
2.2 Les caractéristiques du sperme de Lapin :	11
2.2.1 La couleur :	11
2.2.2 Le volume et la concentration spermatique :	11
2.3 Les facteurs influençant sur la production et la qualité du sperme :	11
2.3.1 La fréquence de la collecte :	12
2.3.2 L'âge et la race :	12
2.3.3 La santé :	13
2.3.4 L'alimentation :	13
2.3.5 La photopériode :	14
2.3.6 La température :	14
2.3.7 La saison :	15
2.4 Méthodes de collecte du sperme de lapin :	15
2.4.1 Matériel de collecte :	15
2.4.2 Technique de collecte :	16
2.4.3 L'entraînement des jeunes mâles à la collecte :	16
2.5 Analyse du sperme :	17
2.5.1 Évaluation macroscopique :	17
2.5.2 Evaluation microscopique :	17

3	Chapitre 3 : Évaluation de la qualité spermatique avec le C.A.S.A	22
3.1	Présentation du CASA :	22
3.2	Principe de fonctionnement :	22
3.3	Analyses sur le CASA :	27
3.3.1	Concentration :	28
3.3.2	Mobilité :	28
3.4	Facteurs influençant les résultats fournis par CASA :	30
3.4.1	La vitesse de capture :	30
3.4.2	Le type de cellule de comptage associé au système CASA :	31
3.4.3	Les algorithmes du système CASA :	31
3.4.4	La concentration spermatique de l'échantillon :	31
3.4.5	Standardisation et mesures de contrôle qualité pour CASA :	32
3.5	Autres applications :	32
	Conclusion	34
	Références bibliographiques	35

Liste des tableaux

Tableaux	Titre	Page
Tableau 1	Echelle adaptée pour la motilité massale.	17
Tableau 2	Echelle pour la motilité individuelle.	18
Tableau 3	Les paramètres cinétiques et leurs fonctions.	26
Tableau 4	Catégories de mobilité et code couleur.	28

Liste des figures

Figures	Titre	Page
Figure 1	Schéma de l'appareil génital du mâle.	03
Figure 2	Coupe sagittale médiane à travers l'urètre et les glandes sexuelles accessoires du lapin mâle domestique.	05
Figure 3	Le cycle spermatogénétique.	07
Figure 4	Structure du spermatozoïde de lapin.	09
Figure 5	Production hebdomadaire de spermatozoïdes en fonction du rythme de prélèvement.	11
Figure 6	Spermatozoïde de lapin.	19
Figure 7	Dispositif CASA.	21
Figure 8	Identification d'un spermatozoïde et sa zone de probabilité.	23
Figure 9	Reconstruction d'une trajectoire. Le centre de la tête spermatique (point de référence) est suivi sur une série d'images d'un spermatozoïde.	23
Figure 10	Paramètres cinématiques des spermatozoïdes mesurés par analyse de sperme assistée par ordinateur (CASA).	24
Figure 11	Trajectoires d'un même spermatozoïde à deux fréquences d'acquisition différentes (30 Hz et 60 Hz).	25
Figure 12	Capture d'écran du logiciel : chaque spermatozoïde a sa trajectoire représentée avec la couleur correspondant à sa catégorie de mobilité.	29

Liste des abréviations

CASA : Computer-aided sperm analysis

FC : Frequence de capture

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

VAP: Average-path velocity

VCL: Curvilinear velocity

VSL: Straight-line velocity

ALH: Amplitude of lateral head displacement

VAP: Average path velocity

LIN: linearity

STR : Straightness

BCF : fréquence croisée des battements

Spz : Spermatozoïde

µm : Micromètre

Introduction

En Algérie, depuis quelques années, l'élevage de lapin connaît un nouvel essor. Les autorités ont mis en place des programmes de développement des productions animales, notamment des petits élevages (aviculture et cuniculture) en vue d'augmenter les apports en protéines animales et de diversifier les productions.

Dans ce contexte, l'utilisation des biotechnologies de la reproduction comme l'insémination artificielle pourrait être une voie prometteuse pour augmenter la production de viande de lapin et améliorer l'élevage de cette espèce.

L'analyse de la semence chez le mâle est d'une grande importance lors de l'évaluation de l'infertilité dans un élevage, car l'échantillon de sperme est très complexe, une variété de cellules entre dans sa composition, en particulier, les spermatozoïdes. Ces cellules hautement différenciées, sont capables de se déplacer librement, activement dans un milieu liquide en dehors du corps masculin, leur permettant de franchir les barrières anatomiques et physiologiques du tractus génital de la femelle **(Suarez et Pacey, 2006)**.

L'analyse spermatique assistée par ordinateur (CASA) a été mise au point vers la fin des années 1980 pour étudier les caractéristiques du mouvement ou la cinématique des spermatozoïdes et s'est avérée très efficace dans le domaine de la recherche. Le logiciel CASA a également été utilisé avec un grand succès pour relever les caractéristiques du sperme telles que la concentration et les proportions de motilité progressive dans de nombreuses espèces animales, y compris une large application dans les laboratoires de reproduction d'animaux domestiques ainsi que ceux de la toxicologie de la reproduction. L'exploitation des résultats obtenus permet une grande avancée dans le domaine de la reproduction des animaux de compagnie et de rente, et surtout d'apporter des solutions à la menace de disparition des animaux par extinction de la race **(VanDer Horst, 2017)**.

Afin de contribuer à construire un capital de connaissances susceptibles de servir à développer la filière cunicole en maîtrisant les biotechnologies de la reproduction à travers l'amélioration des procédés d'évaluation de qualité de la semence, nous nous sommes fixés comme objectif de faire une revue bibliographique sur les différentes méthodes d'évaluation

de la qualité spermatique notamment avec le dispositif informatique CASA en mettant en exergue son intérêt dans l'étude du sperme de lapin.

De ce fait, notre document sera présenté comme suit :

Une revue bibliographique, dans laquelle, nous allons développer trois chapitres essentiels, le premier portant sur des généralités anatomo-physiologiques sur l'appareil reproducteur mâle du lapin. Le deuxième volet, fera référence aux caractéristiques du sperme de lapin et les différentes méthodes d'évaluation de la semence. Et enfin, le logiciel CASA sera développé dans le troisième chapitre. Notre étude s'achèvera par une conclusion.

**Chapitre 1 : Généralités
anatomo-physiologique sur
l'appareil reproducteur mâle du
lapin**

1. Généralités anatomo-physiologiques sur l'appareil reproducteur mâle du lapin

1.1 Rappels anatomiques de l'appareil génital mâle du lapin :

L'appareil génital du mâle situé postérieurement, s'exteriorise par des bourses peu marquées par rapport à d'autres mammifères (**Boussit, 1989**), cet appareil est essentiellement composé de : voies externes d'excrétion, organe copulateur, épидидymes, canaux déférents, glandes annexes et testicules (**Figure1**).

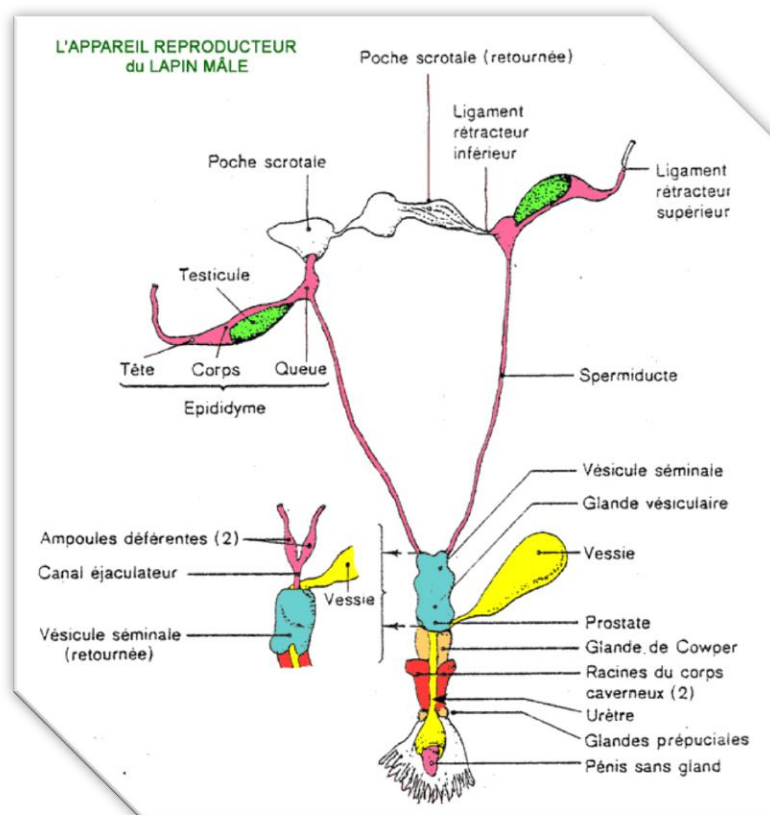


Figure 1 : Schéma de l'appareil génital du lapin mâle (**Lebas, 2009**).

1.1.1 Les testicules :

Les testicules sont situés en annexe de la verge, à l'extérieur de la cavité pelvienne dans une poche entourée d'une peau plissée appelée "scrotum". Ils sont directement entourés d'un tissu conjonctif solide et protecteur appelé "albuginée". Les testicules mesurent en moyenne 3x2x5 centimètres, pour un poids d'environ 18 grammes. Les testicules sont divisés en plusieurs lobules testiculaires qui contiennent les tubes séminifères, lieu de la

spermatogénèse. Entre les tubes séminifères se situe le tissu interstitiel réalisant la fonction endocrine (**Soler et al., 1994**).

1.1.2 Les épидidymes :

Ils sont contigus au bord supérieur des testicules et permettent le transport et la maturation des spermatozoïdes. Chaque épидidyme est constitué de trois parties : la tête, le corps et la queue. La tête volumineuse coiffe le pôle antérieur du testicule. Le corps est également accolé au testicule jusqu'à sa partie postérieure. L'épididyme se termine par la queue, libre, légèrement renflée qui est le lieu de stockage des spermatozoïdes (**Boussit, 1989**).

1.1.3 Les canaux déférents :

La queue de l'épididyme se poursuit par le canal déférent qui fait suite au canal épидidymaire. D'abord contourné, il devient droit pour franchir l'anneau inguinal et gagner la cavité abdominale. Chaque canal atteint la face dorsale de la vessie où il enfle en une ampoule de 2 cm environ avant de se jeter dans l'urètre. Il assure le transit jusqu'à l'urètre grâce à un péristaltisme basal additionné d'une motricité brusque lors de l'éjaculation (**Barone, 2001 ; Bonnes et al., 2005**).

1.1.1 Les glandes annexes :

L'ensemble de leurs sécrétions constitue le liquide spermatique qui, mélangé aux spermatozoïdes, constitue le sperme. Elles sont de plusieurs types :

1.1.3.1 Les vésicules séminales :

Au-dessus de chaque canal déférent, se situe une vésicule séminale qui déverse sa sécrétion dans l'urètre, impaire mais bilobée à son extrémité antérieure. Sa partie caudale fusionne avec les canaux déférents pour former un canal éjaculateur impair (**Boussit, 1989**). Sa taille est extrêmement variable, parfois, elle devient extraordinairement dilatée à cause du liquide qu'elle contient. Le liquide est presque clair et varie d'une consistance peu visqueuse à gélatineuse (**Holtz et Foote, 1978a**).

1.1.3.2 La glande vésiculaire :

Elle est de forme ovale, relativement volumineuse, bilobée et sa couleur blanchâtre est liée à l'accumulation des sécrétions granulaires blanches. Sur la face dorsale, cette glande s'ouvre dans l'urètre par deux canaux excréteurs (**Holtz et Foote, 1978a**).

1.1.3.3 La prostate :

Est la principale glande accessoire de l'appareil génital, située à la face dorso-caudale de la glande précédente. Elle est volumineuse et facilement reconnaissable par sa couleur claire par rapport aux autres glandes annexes. Elle déverse sa sécrétion par 4 à 6 conduits dans l'urètre (**Boussit, 1989**).

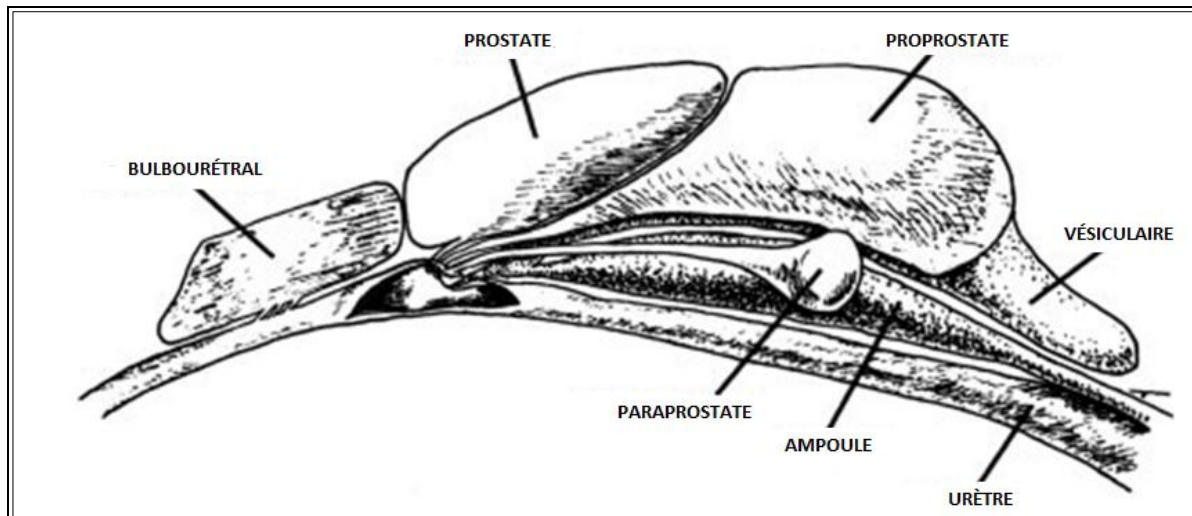


Figure 2 : Coupe sagittale médiane à travers l'urètre et les glandes sexuelles accessoires du lapin mâle domestique (**Holtz et Foote, 1978**).

1.1.4 Les voies externes d'excrétion et l'organe copulateur :

1.1.4.1 Le pénis :

Le pénis est l'organe copulateur, il mesure environ 8 cm de long, dont 4 à 5 cm pour la partie fixe, le corps du pénis est cylindrique, 40 - 50 mm de long et le diamètre diminue à son extrémité. Une caractéristique inhabituelle du lapin est l'absence de gland (**Brewer, 2006**). La partie libre enfermée dans un repli tégumentaire, le fourreau, est lisse et se rétrécit de façon progressive. Le muscle rétracteur du pénis fait défaut. En revanche, le ligament suspenseur du pénis est doublé par une paire de forts muscles sub-ischio-caverneux, qui n'existent dans aucune autre espèce domestique. Ils ont pour fonction de ramener le pénis vers l'avant pendant l'érection. Pendant le repos après un rapport sexuel, le pénis se trouve dans le prépuce situé ventralement à l'anus et caudalement aux testicules (**Boussit, 1989 ; Barone, 2001**).

1.1.4.2 Les glandes préputiales :

Il existe chez le lapin deux glandes préputiales discrètes et ancrées dans le derme du prépuce autour de son orifice. La substance très odorante sécrétée par ces glandes est déposée

dans des petits réservoirs formés par la dilatation de la portion distale d'un follicule pileux **(Holtz et Foote, 1978a)**. Source de phéromones, elle joue un rôle dans le déclenchement de l'ovulation chez la femelle en stimulant le réflexe ovulatoire, mais cette substance ne fait pas partie de l'éjaculat **(Boussit, 1989)**.

1.2 Physiologie de la production spermatique chez le lapin :

1.2.1 Puberté et maturité sexuelle :

Pour certains auteurs, la puberté chez le mâle est le stade à partir duquel l'éjaculat possède les mêmes caractéristiques physiques et chimiques que chez l'adulte. Un tel stade est atteint à partir de l'âge de 24 semaines chez le lapin Néo-Zélandais blanc et coïncide alors, en termes de reproduction, à la maturité sexuelle ou période d'apparition de spermatozoïdes tout à fait viables dans le sperme **(Sabbagh, 1983)**.

Amman et Lambiase **(1967)** définissent la maturité sexuelle comme le moment où la production journalière de sperme n'augmente plus. Ensuite, la production de sperme récolté reste stable ou décroît légèrement.

1.2.2 Spermatogénèse :

Elle est définie par la succession des phases permettant d'obtenir un spermatozoïde mature à partir d'une cellule sexuelle de base ou cellule souche, d'une manière continue dès la puberté. On distingue deux étapes importantes : la phase d'élaboration proprement dite qui correspond au cycle spermatogénétique et la phase de maturation, au niveau de l'épididyme. Au cours de la spermatogénèse, les cellules de la lignée germinale passent par cinq stades cellulaires caractéristiques : spermatogonies, spermatocytes I, spermatocytes II, spermatides et spermatozoïdes **(Boussit, 1989)**.

Au cours de la spermatogénèse, deux évolutions essentielles se produisent **(Posière, 2002)** :

- La réduction du nombre de chromosomes de $2n$ à n , au cours d'une méiose.
- La maturation des cellules germinales aboutissant, à partir de spermatides, à des cellules très hautement différenciées, les spermatozoïdes.

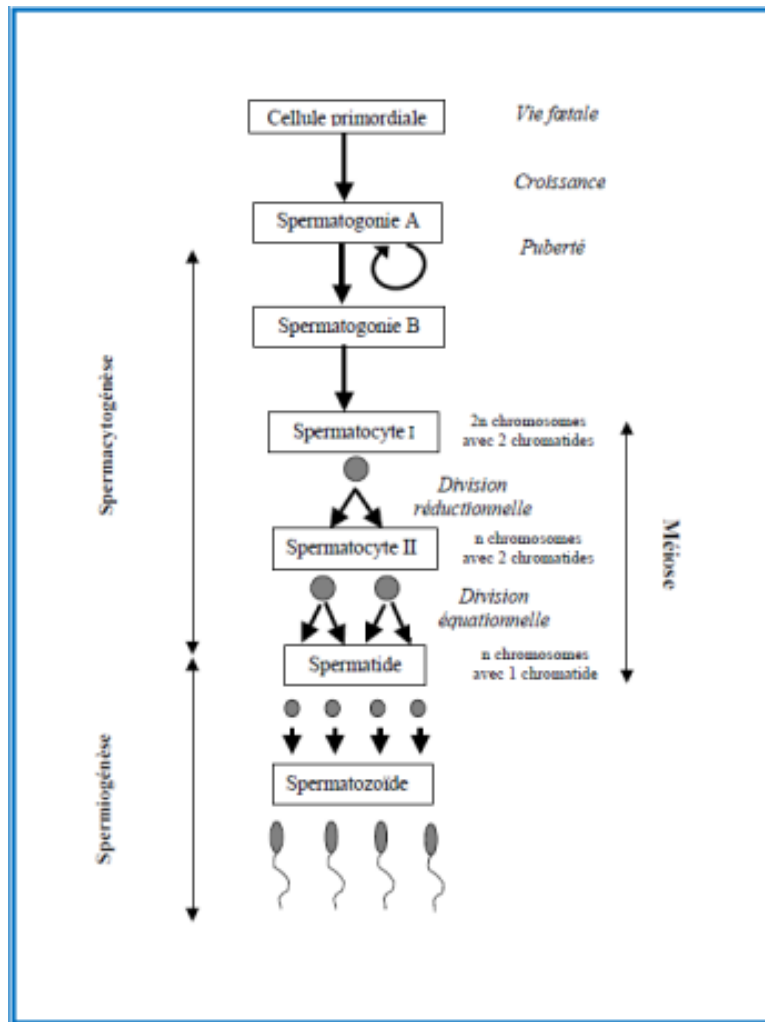


Figure 3 : Le cycle spermatogénétique (Posière, 2002).



Chapitre 2 : Sperme de lapin

2 Sperme de lapin

2.1 La composition du sperme :

2.1.1 Les spermatozoïdes :

Le spermatozoïde mature comprend deux parties principales, la tête et la queue qui sont reliées par le cou (**figure 4**). La queue est composée d'une pièce intermédiaire et deux pièces principale et terminale qui constituent le flagelle (**Baril et al., 1993**), le spermatozoïde de lapin mesure entre 55 et 57 μm dont la tête 6.5 à 9 μm , la pièce intermédiaire 9 μm et la portion principale et terminale 39 μm (**Espinosa et al., 2009**).

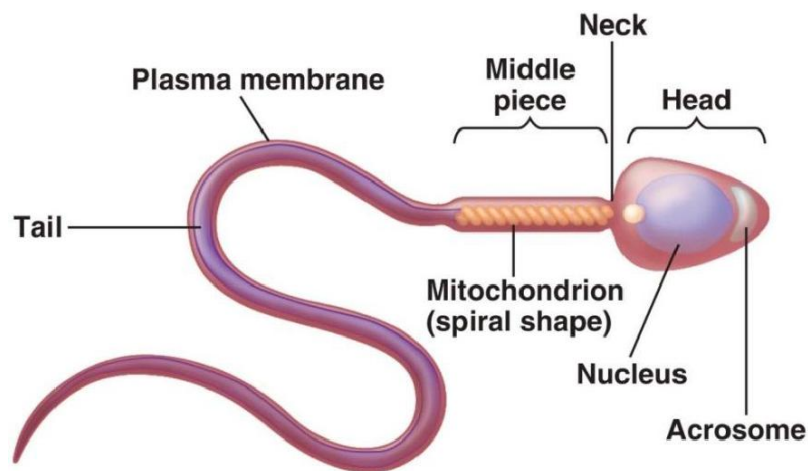


Figure 4 : Structure du spermatozoïde de lapin (**Di Lorio, 2014**)

2.1.2 Le plasma séminal :

Le plasma séminal est constitué par le mélange des sécrétions de l'épididyme et des glandes annexes, il est composé d'une partie fluide et d'une partie gélatineuse ; la partie fluide est un liquide translucide, blanchâtre et visqueux (**Boussit, 1989 ; Alvarino, 1993**). Le liquide séminal assure le transport des gamètes lors de l'éjaculation mais il a également d'autres rôles biologiques.

Le liquide séminal fournit notamment des substrats énergétiques et des substances protectrices aux spermatozoïdes. L'intérêt biochimique de ce produit réside surtout dans la présence des constituants organiques particuliers à savoir le fructose qui constitue une source

importante d'énergie pour les spermatozoïdes, l'acide citrique, les glucides, l'inositol, des acides aminés, des acides gras en très faible quantité en plus des vitamines et diverses variétés d'enzymes (**Derivaux, 1971 ; Bousit, 1989**).

2.1.3 Le gel :

Le gel une substance e muco-gélatineuse sécrétée par les glandes annexes, il est plus ou moins consistant, transparent et peu soluble. Ce gel pose un problème lors de la dilution c'est pour cela il faut l'enlèvement de l'autre fraction spermatique par le glissement le long de la paroi du tube soit par une pipette pasteur, soit par une paille. La présence ou l'absence de gel doit être notée pour caractériser l'éjaculat (**Bousit, 1989**).

2.2 Les caractéristiques du sperme de Lapin :

2.2.1 La couleur :

Le sperme a une coloration blanchâtre. Son opacité dépend surtout de la concentration spermatique. Les éjaculats de faible concentration sont clairs, d'aspect aqueux voire légèrement jaunâtre. Ils contiennent parfois un gel muco-gélatineux plus ou moins consistant et transparent (**Bousit, 1989**).

2.2.2 Le volume et la concentration spermatique :

Le volume est directement lu sur le tube de collecte. Ce volume varie de 0,4 à 1 ml, en fonction des facteurs environnementaux momentanés, de la race, de l'alimentation et de l'âge. Concernant ce dernier, le volume moyen de l'éjaculat augmente significativement avec l'âge. En effet, le volume du sperme éjaculé augmente progressivement jusqu'à huit mois d'âge puis il se stabilise (**Amman et Hammerstedt, 1993**).

La concentration du sperme est le nombre de spermatozoïdes dans un mL de sperme (**Ariola et al., 2001**). La mesure de la concentration peut s'effectuer par numération directe après une dilution du sperme dans une solution susceptible de disperser et de tuer les spermatozoïdes (solution de chlorure de sodium à 3 % ou solution formaldéhyde à 1 %), en utilisant un hématimètre (cellule de Thoma, Burker ou Neubauer) (**Boiti et al., 2005 ; Hanzen, 2009**).

2.3 Les facteurs influençant sur la production et la qualité du sperme :

Plusieurs facteurs peuvent influencer la production ou les composants spermatiques, parmi eux on retrouve :

2.3.1 La fréquence de la collecte :

Bien que la production de sperme soit très variable entre les mâles et selon les éjaculats pour un même mâle, la fréquence des collectes influence directement la quantité et la qualité de la semence (**Joly et Theau-Clément, 2000**). Différentes études ont rapporté l'effet du rythme de prélèvement sur la qualité de la semence en utilisant des protocoles différents. Le nombre de prélèvements par jour peut varier de 1 à 4 (**Bodnar et al., 1996 ; Bunaciu et al., 1996 ; Lopez et al., 1996 ; Mocé et al., 2000a**). A partir du 3ème prélèvement, le volume, la concentration et le nombre des doses pour l'insémination diminuent (**Lopez et al., 1996**). Le nombre de jours de collecte par semaine peut varier d'un jour de prélèvement (**Bencheikh, 1995 ; Bunaciu et al., 1996 ; Arroita et al., 2000 ; Mocé et al., 2000a**) à des prélèvements journaliers (**Bodnar et al., 1996**). Dans ce cas, le volume et la concentration spermatiques sont altérés lorsque le rythme de collecte augmente (**Bencheikh, 1995 ; Bodnar et al., 1996 ; Bunaciu et al., 1996 ; Arroita et al., 2000**) tandis que le nombre de spermatozoïdes prélevés par semaine est plus élevé dans les rythmes les plus intensifs (**Bencheikh, 1995 ; Nizza et al., 2003**) voir (Figure 5).

Un rythme de prélèvement extensif améliore la motilité et le pourcentage de spermatozoïdes vivants (**Bencheikh, 1995 ; Bodnar et al., 1996**).

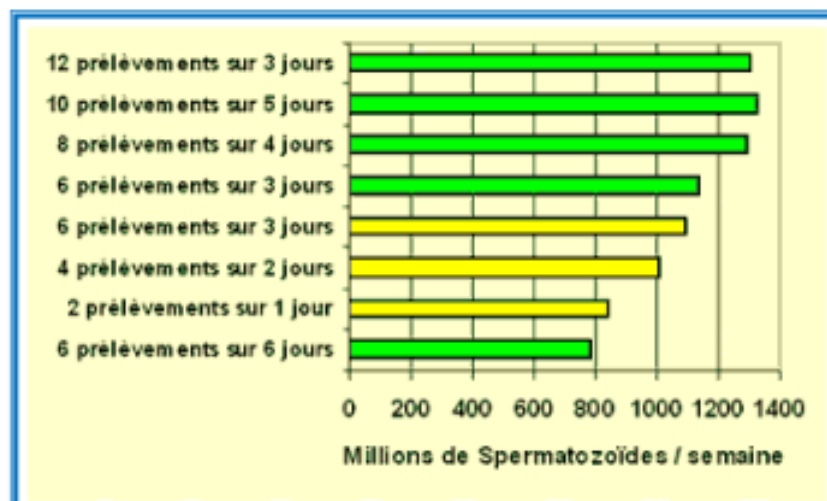


Figure 5 : Production hebdomadaire de spermatozoïdes en fonction du rythme de prélèvement (**Bunaciu et al., 1996 ; barres vertes** et **Bencheikh, 1983 ; barres jaunes**).

2.3.2 L'âge et la race :

L'âge des lapins mâles influence significativement le pH, la concentration et le nombre des spermatozoïdes totaux et mobiles obtenus dans l'éjaculat. En effet, le sperme des mâles adultes par rapport à celui des jeunes (37-43 semaines) présente un volume, une concentration

et un nombre de spermatozoïdes totaux et motiles plus élevés (**Alvarino, 1993 ; Theau-Clément et al., 2009**).

Selon García et al. (**2004**), les mâles peuvent être considérés comme immatures jusqu'à l'âge de 9 mois, car la production et la qualité de la semence sont faibles. La période entre 10 et 18 mois représente le meilleur moment d'utilisation des mâles pour l'insémination artificielle et au-delà (19 – 25 mois), une nette diminution de la concentration et du volume avec une augmentation du taux des anomalies spermatiques sont observées. Récemment, certains auteurs ont montré que la structure de la chromatine des spermatozoïdes de lapins âgés entre 5 et 28 mois est significativement changée. Les plus faibles pourcentages de spermatozoïdes avec une chromatine endommagée (de 1,7 à 2,4%) ont été trouvés entre 6 et 16 mois d'âge et les plus élevés ont été trouvée dans les éjaculats des mâles de moins de 5 mois et plus de 20 mois d'âge (**Gogol et al., 2002**)

2.3.3 La santé :

L'inflammation de l'appareil reproducteur mâle affecte les différentes fonctions testiculaires et les caractéristiques séminales en altérant la biosynthèse des eicosanoïdes pro-inflammatoires et des cytokines. La concentration élevée des leucocytes induite par une infection au cours de la spermatogénèse réduit fortement l'intégrité de l'acrosome en augmentant la production des radicaux libres (**Castellini, 2008**). L'inflammation de l'appareil reproducteur masculin touche les fonctions testiculaires et séminales (**Boiti et al., 2005**).

2.3.4 L'alimentation :

Des études ont démontré qu'un régime alimentaire limité réduit la libido et quelques traits séminaux chez le lapin mâle, cependant le facteur le plus important reste la qualité plutôt que la quantité du régime alimentaire (**Luzi et al., 1996**).

Il est recommandé que l'aliment donné aux lapins comporte plus de 15% de protéines (**Nizza et al., 2000**).

La majeure partie des lipides constituant le spermatozoïde de mammifère est représenté par les acides gras poly-insaturés qui ont un rôle notamment dans la fluidité des membranes. L'organisme ne peut synthétiser par lui-même ces acides gras d'où leurs nécessités dans l'alimentation des lapins (**Apel-Paz et al., 2003**).

2.3.5 La photopériode :

La longueur du jour (16 heures de lumière et 8 heures d'obscurité) qui agit sur l'axe hypothalamo-hypophysaire permet la production des hormones et des spermatozoïdes (**Castellini, 2008**).

La saison a des effets sur les caractéristiques du sperme (**Theau-Clement et al., 2009**), le volume d'éjaculat et la concentration en spermatozoïdes sont au maximum au mois de mars et au minimum au mois de juillet (**Sabbagh, 1983**). Un autre travail est effectué par **Najjar et ben Mrad (2013)** qui porte sur les facteurs de variations de la qualité du spermogramme du lapin reproducteur, dans lequel il a été constaté que les paramètres du spermogramme des lapins reproducteurs de souche INAT, en particulier pour les paramètres volume du gel, pH, motilité massale, motilité individuelle et concentration en spermatozoïde ont été améliorés durant la saison printanière.

Cependant, certains auteurs ont noté que l'intensité de la lumière n'avait pas d'effet de façon significative sur les caractéristiques du sperme mais plutôt sur l'éjaculat (**Besenfelder et al., 2004**).

2.3.6 La température :

Les effets de la température sur la fonction de la reproduction des lapins mâles ont été étudiés quasi exclusivement pour les températures élevées, dans la mesure où des températures faibles (inférieures à 10°C, voire 0°C) ne semblent nullement perturber les lapins dans leurs activités sexuelles (**Lebas, 2009**). Au-dessus d'une température ambiante de 30°C, l'activité sexuelle du lapin est réduite suivie d'une chute de la spermiogénèse et de la qualité de la semence (**Finzi, 1990 ; Lebas, 2009**). Ainsi, un stress thermique de 8 heures à 34°C appliqué un ou cinq jours consécutifs à des lapins, entraîne un accroissement très net du taux de spermatozoïdes morts et des cellules pyriformes probablement lié à l'accroissement de la température rectale ou surtout scrotale (**Kasa et Thwaites, 1992**).

Par contre, l'effet de températures élevées appliquées pendant de plus longues périodes semble plus controversé. Certains auteurs mentionnent une baisse du volume des éjaculats et de la concentration spermatique chez les lapins laissés 5 semaines à 33°C (**Lebas, 2009**), alors que d'autres signalent que des lapins maintenus pendant 2 mois à raison de 21 heures par jour à 30°C ont une production spermatique (volume des éjaculats et concentration en spermatozoïdes) nettement plus élevée pendant la période à haute température, que durant la

période à 20°C (**Finzi et al., 1994**). Les températures ambiantes élevées influent négativement sur le taux d'anomalies des spermatozoïdes du sperme récolté sur les lapins soumis au stress thermique (**Finzi et al., 1995**).

2.3.7 La saison :

Les caractéristiques de la semence sont influencées par la saison. Selon **Bonnano et Costanzo (1987)**, la production spermatique (pourcentage de cellules motiles, vitesse d'acheminement et concentration) est supérieure en automne comparée au printemps, alors qu'elle est nettement inférieure en été. La saison estivale a un effet dépressif sur le volume, la motilité et le nombre de spermatozoïdes par éjaculat.

2.4 Méthodes de collecte du sperme de lapin :

2.4.1 Matériel de collecte :

Chez le lapin, la collecte du sperme se fait habituellement à l'aide d'un vagin artificiel, un dérivé des modèles utilisés chez d'autres espèces. C'est un réceptacle qui fournit à l'organe copulateur des stimuli thermiques et mécaniques et de l'élasticité nécessaire pour l'éjaculation (**Alvarino, 1993**). Plusieurs modèles (commercial ou artisanal) ont été créés avec de l'aluminium, le plastique ou même le verre (**Castellini, 1996**).

Le principe du vagin artificiel est très simple : du liquide à température voisine du vagin de la lapine est contenu entre une gaine en caoutchouc ou en latex et un support rigide constitué de PVC ou de matière plastique dure. A l'une des extrémités se trouve un orifice d'introduction du pénis et à l'opposé, un orifice de récolte du sperme où est fixé le tube de collecte. La forme, le diamètre et la longueur du vagin artificiel conditionnent la bonne tenue en main. Un espace trop important à l'intérieur du vagin peut induire un refus d'intromission car la vulve et le vagin créent une certaine pression sur le pénis, d'où la nécessité d'injecter de l'eau entre la capote et le support rigide. On peut déposer un gel lubrifiant (non spermicide) comme la vaseline sur le latex afin de limiter les risques d'inflammation du pénis (**Boussit, 1989**). La température du liquide contenu dans le vagin doit avoisiner en moyenne 42°C (40-45°C) au moment de la récolte (**Morrell, 1995 ; Boiti et al., 2005**). Pour maintenir une température adéquate de l'eau du vagin artificiel, 10-15 g de glycérol ou de glycérine peuvent être ajoutés. Aussi, de l'eau préchauffée (50-58°C) peut également être injectée régulièrement (**Arencibia et Rosario, 2009**). Cependant, la technique la plus fiable est de disposer d'une enceinte chauffée et thermostatée permettant de stocker à l'avance un nombre important de

vagins pour lesquels la température est automatiquement maintenue (**Boussit, 1989**). L'augmentation de la température de l'eau dans le vagin artificiel au-delà de 50°C entraîne une contamination de l'éjaculat avec l'urine, en revanche, si la température est inférieure à 40°C le lapin refuse d'éjaculer et la quantité du gel et des granules séminales augmente, ce qui entrave la manipulation de l'éjaculat et modifie sa qualité (**Morrell, 1995 ; Arencibia et Rosario, 2009**).

2.4.2 Techniques de collecte :

Au moment de la récolte spermatique une femelle bout-en-train est introduit dans la cage du mâle, pendant quelques secondes afin de déclencher le processus d'accouplement. Dès que le mâle tente de chevaucher la femelle, l'opérateur attrape celle-ci par la peau des épaules afin de l'immobiliser. La main libre tenant le vagin artificiel passe sous l'abdomen de la femelle et relève le train arrière (recherche de la position de lordose). Le vagin artificiel, tenu au creux de la main, se trouve juste sous la zone uro-génitale légèrement en retrait sous l'abdomen. Ces opérations doivent s'effectuer rapidement pour profiter de la libido exacerbée du mâle. Le comportement du mâle est strictement identique à celui qu'on observe lors de la saillie naturelle. L'opérateur peut néanmoins orienter le vagin artificiel afin de faciliter l'intromission du pénis (**Boussit, 1989 ; Arencibia et Rosario, 2009**).

2.4.3 L'entraînement des jeunes mâles à la collecte :

Les jeunes lapins peuvent commencer l'entraînement à la récolte avec un vagin artificiel dès l'âge de 5 mois (**Garcia-Thomas et al., 2006 ; Lavara et al., 2008 ; Theau-Clément et al., 2009**). Lorsque la femelle bout-en-train est introduite dans la cage du mâle comme cela a été décrit précédemment, le jeune mâle se rapproche généralement de la femelle avec prudence et la renifle. Quelques minutes après, il tente de monter et de démarrer le chevauchement. Une fois que le pénis pénètre dans le vagin artificiel, l'éjaculation se produit de suite. Lors de la prochaine session d'entraînement, le mâle associe l'introduction de la femelle dans sa cage avec l'éjaculation et monte donc facilement. Il est donc important que l'intervalle entre les sessions d'entraînement des mâles ne soit pas trop long afin que cette association reste en mémoire.

Des entraînements tous les jours ou tous les deux jours sont souhaitables lors de la première semaine (**Morrell, 1995**). Cependant, d'autres auteurs précisent que durant la phase d'entraînement une collecte d'une fois par semaine pendant deux semaines à un mois peut suffire (**Garcia-Thomas et al., 2008 ; Theau-Clément et al., 2009**).

2.5 Analyse du sperme :

2.5.1 Évaluation macroscopique :

➤ La couleur :

La couleur idéale optimale de la semence est blanc nacré. En effet la couleur peut être modifiée par la présence d'éléments anormaux **(Alvarino, 2000)** :

- La couleur jaune indique la présence de pus ou d'urine.
- La coloration rougeâtre, voire rosée, peut être due à la présence du sang frais à cause d'une lésion ou une irritation du pénis ou de l'urètre.
- La couleur marron témoigne de la présence d'éléments sanguins dégénérés ou une contamination par les matières fécales.
- La coloration blanchâtre ou transparente indique une faible concentration en spermatozoïdes.
- L'aspect opaque témoigne d'une dégénérescence testiculaire avec passage des cellules géantes dans l'épididyme ou une inflammation des vésicules séminales.

➤ Le volume :

La mesure du volume du sperme s'effectue par plusieurs méthodes, certains auteurs utilisent un tube de collecte calibré ou gradué après l'enlèvement du gel **(Boussit, 1989)**, le volume de la semence varie entre 0.3 et 6.0 mL **(Alvarino, 2000)**.

➤ Le PH :

Le pH est situé normalement entre 6 et 7.3 et peut atteindre 7.5. En général, à partir d'un pH de 7.2, la concentration, la motilité et la viabilité spermatique diminuent. Toute variation de pH par rapport au pH optimal indique une mauvaise qualité de la semence. La mesure du pH (pH mètre, papier indicateur) doit être immédiate car le sperme s'acidifie rapidement suite à la formation d'acide lactique, résultant de l'utilisation des sucres par les spermatozoïdes **(Alvarino, 2000 ; Arencibia et Rosario, 2009)**.

2.5.2 Evaluation microscopique :

➤ La motilité :

✓ Motilité massale :

L'emploi du terme motilité signifie que les spermatozoïdes se meuvent par eux-mêmes et ne se déplacent pas. La motilité est la traduction littérale de l'anglais « motility » (**Hanzen, 2009**). C'est une mesure rapide et facile qui nécessite un examen microscopique de la semence, dès que celle-ci est collectée. Une goutte de sperme pur est déposée sur une lame et placée sur la platine chauffante du microscope (37°C-38°C) sous un grossissement de x80 à x120. L'observation doit être faite très rapidement car la motilité massale du sperme pur, à cette température, diminue rapidement au bout de 15 à 20 secondes. Dans des conditions optimales, on observe de véritables vagues, et la motilité d'ensemble, peut être appréciée à l'aide d'une grille proposée par **Pitremont (1994) (tableau 1)**. Une note de 0 (immobilité totale) à 5 (Tourbillons rapides) ou de 0 (pas de spermatozoïdes) à 9 (aspects de tourbillons) est attribuée à l'échantillon observé lors de cet examen, les turbulences engendrées par la conjugaison des mouvements issus de tous les spermatozoïdes présents dans la goutte de semence sont notées (**Boussit, 1989 ; Baril et al.,1993**).

Tableau1 : Echelle adaptée pour la motilité massale (**Pitremont, 1994**).

Note	Motilité
0	Pas de mouvement
1	Léger mouvement
2	Mouvement net mais pas de vagues
3	Début de vagues et mouvements intenses
4	Vagues nettes
5	Tourbillons

✓ **Motilité individuelle :**

Cette mesure est réalisée en déposant une goutte de semence diluée entre lame et lamelle, observées au microscope avec un grossissement de x160 à x240 sur une platine chauffante à 37-38°C. Les spermatozoïdes dotés d'une motilité dite « fléchante » sont ceux présentant une trajectoire quasi rectiligne et capable de traverser le champ en 2 à 3 secondes. Les spermatozoïdes présentent des mouvements rotatoires circulaires ou des mouvements d'amplitude très réduite ne sont donc pas comptabilisés dans les spermatozoïdes mobiles. La mesure est réalisée en utilisant une échelle allant de 0 à 5 ou de 0 à 4 (**tableau 2**). Cette

estimation doit tenir compte donc de la vitesse de déplacement des spermatozoïdes, de la rectitude de celui-ci et des mouvements latéraux (**Boussit, 1989 ; Baril et al.,1993 ; Cabanne, 2008**).

Tableau 2 : Echelle pour la motilité individuelle (Andrieu, 1976).

Note	Motilité
0	Spermatozoïdes immobiles.
1	Les spermatozoïdes ont un mouvement de flagelle sans déplacement.
2	Les spermatozoïdes se déplacent lentement. Les mouvements circulaires dominant.
3	Les spermatozoïdes ont des mouvements heurtés. Leur déplacement s'effectue le long d'une hélice de diamètre sensiblement à leur longueur ou de cercles de larges diamètres (plusieurs fois la longueur des gamètes).
4	Les spermatozoïdes se déplacent rapidement le long d'une hélice de faible diamètre.

➤ **La concentration :**

La concentration du sperme est le nombre de spermatozoïdes dans un mL de sperme. La dilution se fait par une solution de fixation contenant 10 ml de formol à 35% v/v dans 1 L de NaCl à 0,9% (**Ariola J. et al., 2001**). **Boussit (1989)** a montré que la précision est optimale pour une dilution de 1/200. La concentration varie entre 300 et 700 x 10⁶ spz/ml. Le comptage se fait par une cellule hématométrique, exemple cellule de Thoma (**Raphaël et al.,2004**).

➤ **La viabilité :**

Une coloration vitale à l'éosine-nigrosine permet de classer les spermatozoïdes qui sont morts ou vivants après de dénombrement de 200 spz. Les spermatozoïdes morts ont leur membrane perméable et prennent une coloration rosée. Les spermatozoïdes vivants ont une membrane imperméable et apparaissent incolores (**Alvarino, 2000**). Le colorant le plus utilisé

est l'éosine-nigrosine car il présente l'avantage de permettre l'évaluation de la morphologie et de la viabilité des spermatozoïdes.

➤ **La morphologie :**

La morphologie du spermatozoïde du lapin est déterminée par la réalisation d'un frottis après coloration à l'éosine-nigrosine qui permet de classer les spermatozoïdes normaux et anormaux (**figure 6**). La morphologie des spermatozoïdes sera détectée par une analyse microscopique (100x) (**Johnston et al., 2001**).

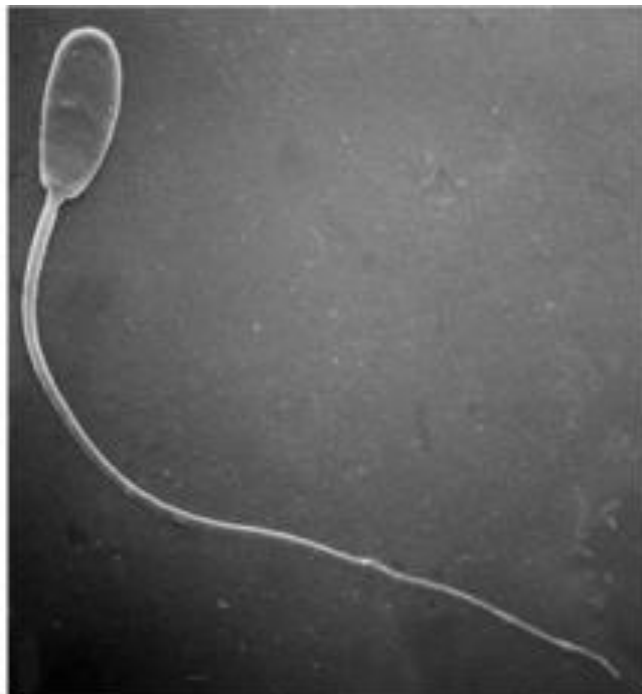
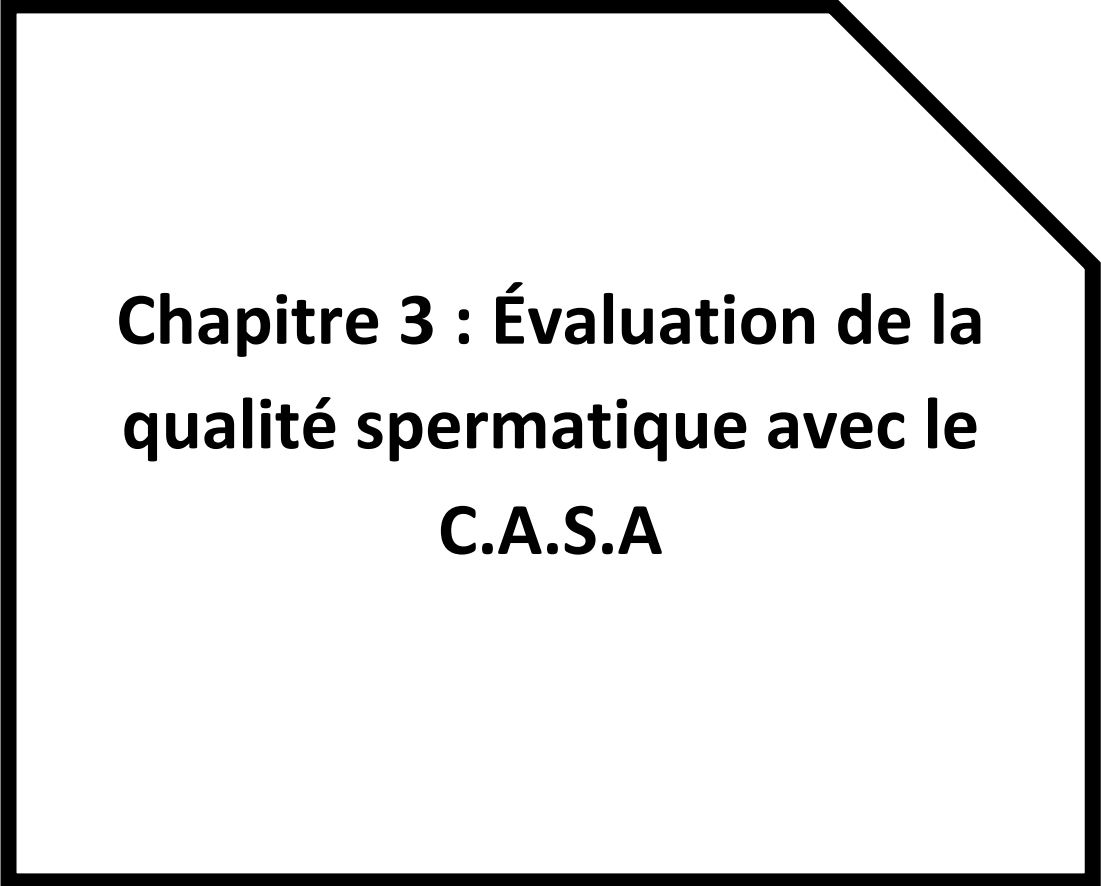


Figure 6 : Spermatozoïde de lapin (Lebas, 2010).

➤ **L'intégrité de la membrane acrosmique :**

Pour évaluer la qualité du sperme le test le plus pertinent consiste à déclencher la réaction acrosomique et à estimer la proportion de spermatozoïdes vivants qui sont capables d'effectuer ce processus. Le statut acrosomial peut-être évalué à l'aide de colorations fluorescentes ou non fluorescentes (**Boiti et al., 2005 ; Cabannes, 2008**). D'autres techniques comme l'immunofluorescence indirecte au moyen d'anticorps polyclonaux ou monoclonaux ainsi que la coloration à la chlortétracycline (antibiotique aux propriétés fluorescentes) peuvent également être utilisées pour évaluer le statut acrosomial (**Boiti et al., 2005**).



**Chapitre 3 : Évaluation de la
qualité spermatique avec le
C.A.S.A**

3 Évaluation de la qualité spermatique avec le C.A.S.A

3.1 Présentation du CASA :

L'acronyme CASA signifie Computer-Aided Sperm Analysis. Comme son nom l'indique, il s'agit d'une méthode semi-automatisée permettant l'analyse à partir d'un échantillon de sperme de paramètres spermatiques tels que la concentration, la mobilité, la vitalité ou encore la morphologie des spermatozoïdes mais aussi les paramètres cinétiques à travers une analyse fine du mouvement flagellaire non observable par l'œil humain. Le système est composé d'un microscope optique à contraste de phase négatif relié à un logiciel informatique par l'intermédiaire d'une caméra permettant la digitalisation des images (**figure 7**), c'est-à-dire la transformation des images capturées par la caméra en images numériques.

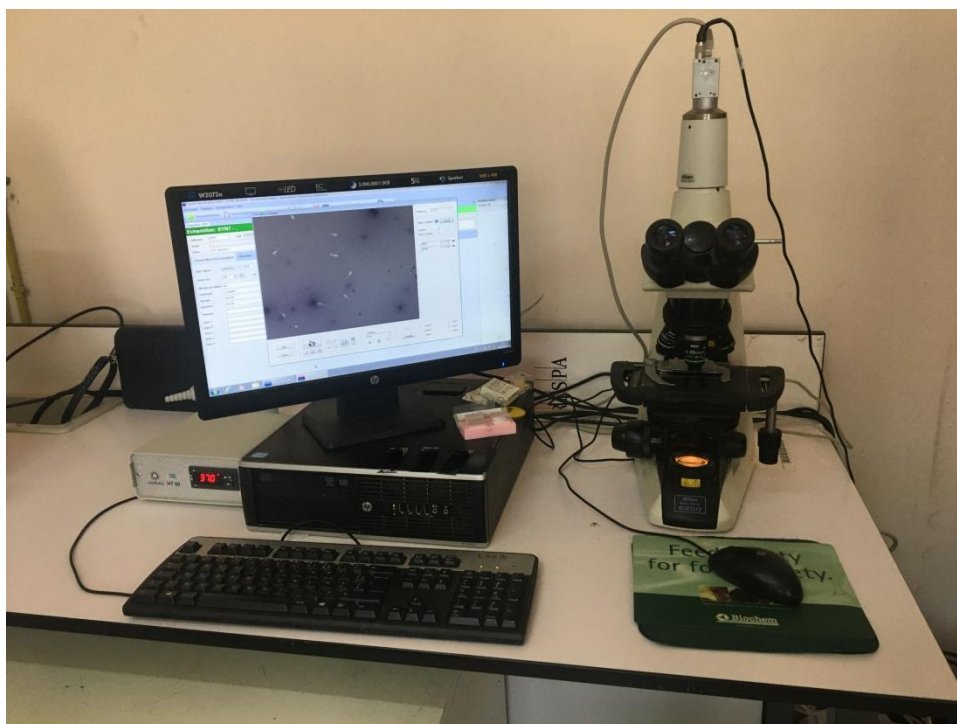


Figure 7 : Dispositif CASA (photo personnelle, 2022).

3.2 Principe de fonctionnement :

Il s'agit en effet d'une méthode semi-automatisée puisque l'opérateur doit se déplacer sur la chambre de comptage pour permettre l'acquisition des différents champs. Il est important que les champs analysés soient à différentes distances du site de dépôt de l'échantillon dans la chambre, principalement le long de l'axe central formé par les points

d'entrée et point de sortie de la lame (**Amann et Waberski, 2014**), car la distribution des spermatozoïdes dans la chambre n'est pas homogène (**Douglas-Hamilton et al., 2005**).

Tout comme cela est réalisé pour la méthode manuelle, plusieurs champs doivent être analysés pour obtenir un nombre suffisant de spermatozoïdes. Le manuel de **l'OMS 2010** recommande l'analyse de 2 chambres par individu avec d'une part un minimum de 200 spermatozoïdes analysés par chambre et d'autre part 6 champs minimum par chambre. Chaque champ correspond à l'acquisition d'une série d'images à une fréquence de 60 Hz (= Hertz = 60 images par seconde) sur une durée de 0,5 seconde, soit 30 images par champ.

Lors d'une acquisition, chaque image d'un champ au microscope est transmise par la caméra au logiciel pour ensuite être convertie en une image numérique (**Mortimer, 2000**) : la digitalisation. Avant la capture de chaque champ, la luminosité doit être adaptée manuellement sur le microscope après avoir fait la mise au point (netteté à adapter sur l'image à l'écran) : le logiciel prévoit pour cela un indicateur de luminosité qui doit se trouver entre 55 et 65 pour être acceptable.

Puis, chaque spermatozoïde et sa trajectoire correspondante sont analysés individuellement. Le microscope optique à contraste de phase négatif permet une identification du spermatozoïde optimisée : on observe les spermatozoïdes blancs grâce à leur réfringence sur un fond noir (**Manuel fournisseur Hamilton Thorne ; Mortimer, 2000**). Cette réfringence reste constante même si le spermatozoïde est mobile car la rotation de la tête spermatique lors du mouvement ne modifie pas l'intensité de la réfringence (**Mortimer, 2000**).

Lors de la digitalisation de l'image, le logiciel détermine le nombre de pixels pour chaque tête spermatique grâce au contraste entre la tête blanche et le fond noir. Il existe alors un nombre de pixels acceptable pour que la surface puisse être identifiée comme une tête de spermatozoïde : cela correspond aux valeurs minimum et maximum de taille de la tête nécessaires à l'identification par le logiciel de chaque spermatozoïde (**Mortimer, 2000**).

L'identification du spermatozoïde est réalisée selon trois critères :

- La taille de la tête spermatique : minimum 5 μm^2 – maximum 50 μm^2 .
- La réfringence de la tête spermatique et du flagelle : luminosité minimum de la tête 170 -luminosité minimum du flagelle 70.
- L'élongation correspondant au rapport de la longueur et de la largeur de la tête : minimum 1% - maximum 100%.

La position d'un spermatozoïde est définie par le centre de la tête spermatique et ses coordonnées (x, y) sont alors déterminées. Pour chaque position de la tête d'un spermatozoïde, le logiciel calcule la probabilité de la nouvelle position sur l'image suivante grâce une zone de probabilité au rayon prédéterminé. Ce rayon est la distance maximum qu'un spermatozoïde est censé parcourir sur la période de temps séparant 2 images.

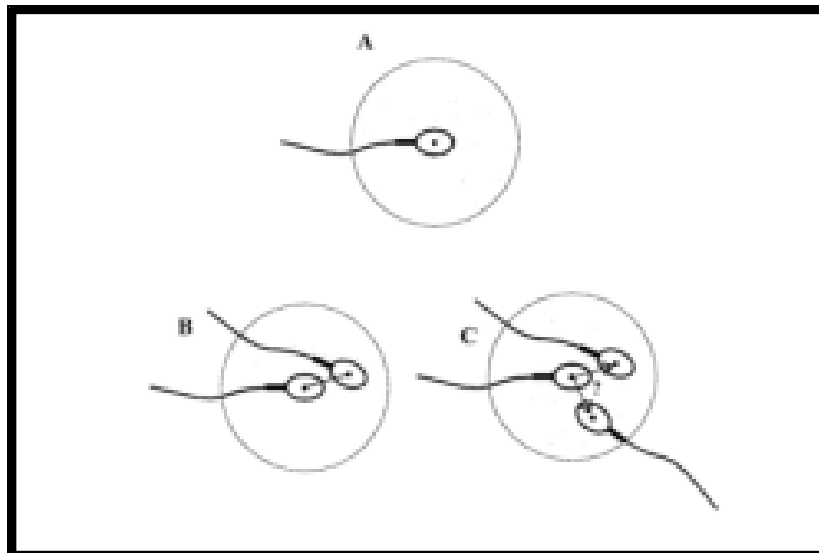


Figure8 : Identification d'un spermatozoïde et sa zone de probabilité (Mortimer et al, 2000).

La trajectoire d'un spermatozoïde est alors reconstruite à partir de la succession des différentes positions de la tête sur les 30 différentes images constituant un champ.

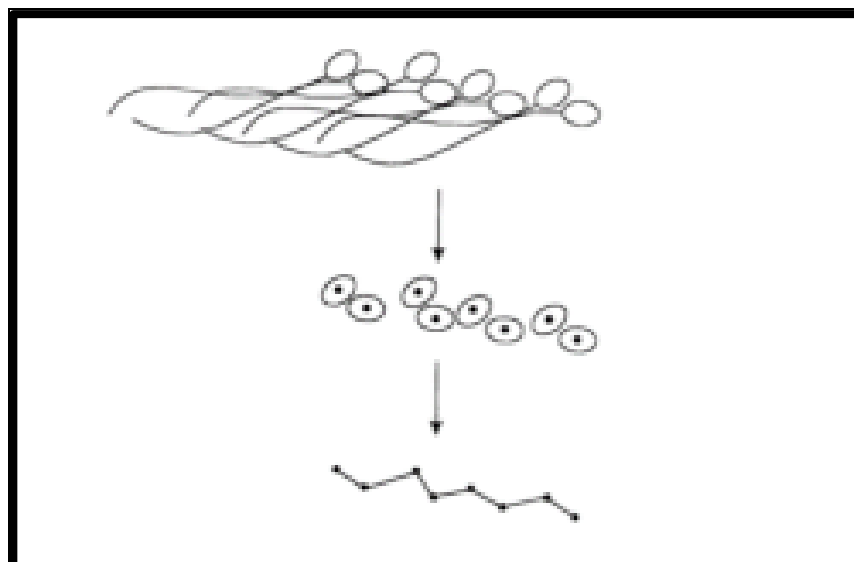


Figure 9 : Reconstruction d'une trajectoire. Le centre de la tête spermatique (point de référence) est suivi sur une série d'images d'un spermatozoïde (Mortimer, 2000).

Grâce à la reconstruction de la trajectoire du spermatozoïde (**figure 11**), le logiciel peut fournir des paramètres « annexes » qui sont les paramètres cinétiques dont le manuel de l'OMS 2010 donne les définitions pour les principaux suivants :

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

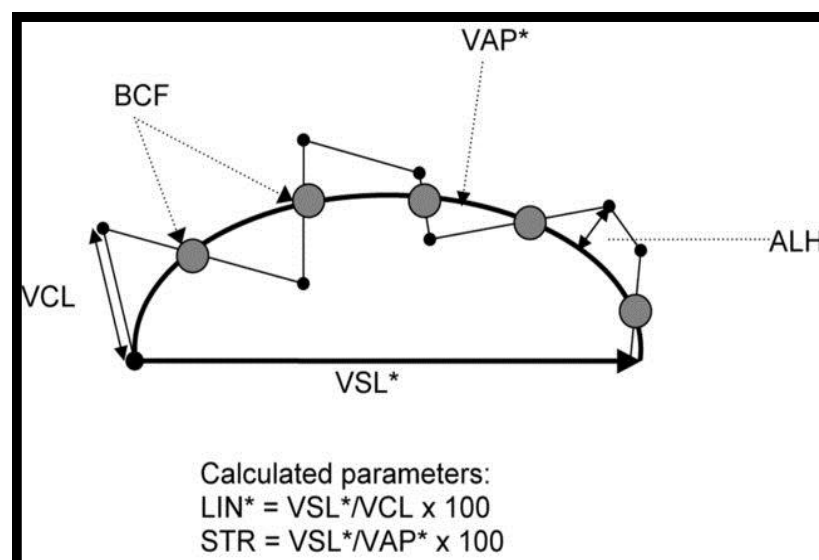


Figure 10 : Paramètres cinématiques des spermatozoïdes mesurés par analyse de sperme assistée par ordinateur (CASA) (**Solter et al, 2006**)

ALH, amplitude de la tête latérale ; BCF, fréquence croisée des battements ; LIN, linéarité ; STR, rectitude de trajectoire ; VCL, vitesse curviligne ; VSL vitesse en ligne droite ; VAP, vitesse moyenne dans le temps.

Cependant, le manuel de l'OMS 2010 ne fournit pas de valeurs de référence pour ces paramètres. En effet, les différents systèmes CASA n'utilisent pas les mêmes algorithmes pour obtenir ces paramètres cinétiques ce qui rend difficile à ce jour la comparabilité de ces mesures entre les systèmes.

Un inconvénient du système CASA est que la forme de la trajectoire du spermatozoïde peut être modifiée selon le nombre d'images acquises par seconde. En effet, un même spermatozoïde analysé à deux fréquences différentes (respectivement 30 et 60 images par seconde) possèdera une trajectoire reconstruite et donc des valeurs cinétiques différentes **(Figure 10) (Mortimer et al., 1988)**. A noter, une fréquence d'acquisition d'images augmentée permet d'obtenir plus d'informations disponibles sur la trajectoire. Cela souligne l'importance du réglage des paramètres CASA et l'impact potentiel sur les résultats, l'OMS recommande ainsi une fréquence d'acquisition de 60 images par seconde (soit 60 Hz).

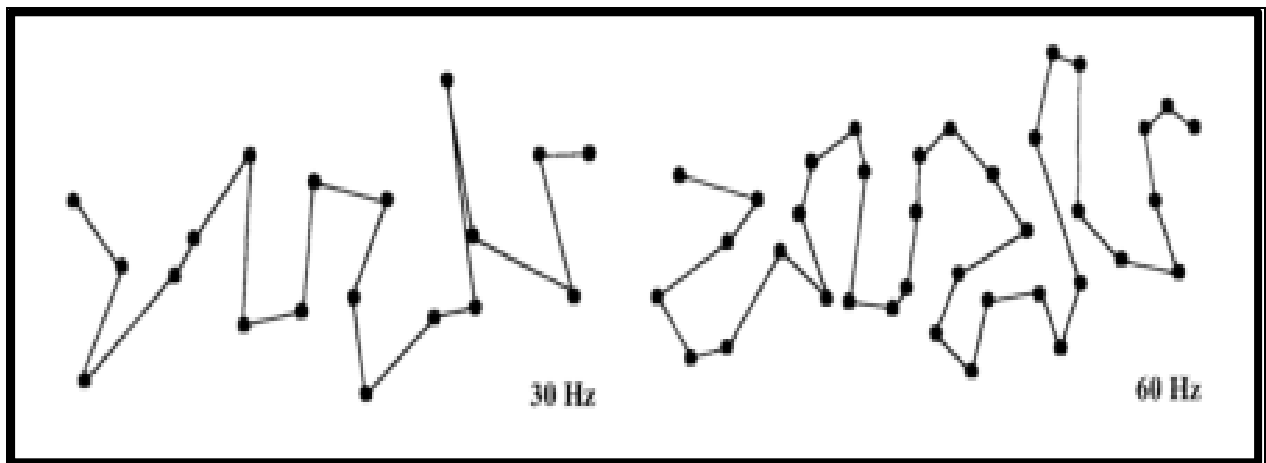


Figure 11 : Trajectoires d'un même spermatozoïde à deux fréquences d'acquisition différentes (30 Hz et 60 Hz) **(Mortimer et al., 1988)**.

Par conséquent, plusieurs paramètres cinétiques des spermatozoïdes sont dépendants de la fréquence d'acquisition dont par exemples les valeurs VCL et ALH qui seront plus élevées lors d'une augmentation de la fréquence **(Mortimer et al., 1988)**.

Des cut-offs (valeur maximale ou minimale) de certains de ces paramètres cinétiques **(Tableau 3)** sont définis afin de pouvoir classifier chaque spermatozoïde dans la catégorie de mobilité

correspondante selon les recommandations de l'OMS 2010 : mobilité progressive, mobilité non progressive et immobiles.

Tableau 3 : Les paramètres cinétiques et leurs fonctions *(Manuel fournisseur Hamilton Thorne)*

Paramètres cinétiques	Fonction
STR progressive (STRP)	Valeur minimale de STR en % requise pour qu'une trajectoire soit comptée comme progressive
VAP progressive (VAPP)	Valeur minimale de VAP requise pour qu'une trajectoire soit comptée comme progressive
VAP lente (VAPS)	Valeur maximale de VAP en $\mu\text{m/s}$ pour laquelle une trajectoire peut être comptée comme lente
VSL lente (VSLS)	Valeur maximale de VSL en $\mu\text{m/s}$ pour laquelle une trajectoire peut être comptée comme lente
Algorithme statique	Détermine quel algorithme est utilisé pour définir les spermatozoïdes statiques. L'algorithme utilisé dans notre cas est le multiplicateur de largeur statique.
VAP statique (VAP STATIC)	Valeur maximale de VAP pour qu'un spermatozoïde soit compté comme statique
VSL statique (VSL STATIC)	Valeur maximale de VSL pour qu'un spermatozoïde soit compté comme statique
Multiplicateur de largeur statique	Basé sur la largeur de la tête spermatique et définit le mouvement maximum qu'une tête spermatique peut faire tant en étant toujours classifié comme statique

3.3 Analyses sur le CASA :

Le manuel de l'OMS 2010 recommande l'analyse de 2 chambres par individu avec un minimum de 200 spermatozoïdes analysés par chambre et 6 champs minimum par chambre.

L'analyse de la concentration et l'analyse de la mobilité des spermatozoïdes sont réalisées simultanément par le logiciel.

3.3.1 Concentration :

Le manuel du fournisseur du logiciel détaille les règles de comptage. Chaque spermatozoïde entrant dans le champ durant les 10 premières images sont comptés durant l'acquisition. Le corollaire est que tout spermatozoïde sortant du champ durant les 10 premières images ne sont pas comptés pour correctement déterminer la concentration. Tout spermatozoïde entrant dans le champ après les 10 premières images est identifié mais n'est pas compté et tout spermatozoïde quittant le champ après les 10 premières images est bien compté. Au total, seulement les spermatozoïdes présents sur les 10 premières images affectent le calcul de la concentration spermatique

Les concentrations spermatiques allant de 2 millions/mL jusqu'à 50 millions/mL de spermatozoïdes peuvent être mesurées à partir d'un échantillon de sperme pur (**Garrett et al., 2003**). Au-delà de 50 millions/mL, une dilution est nécessaire (**OMS, 2010**)

3.3.2 Mobilité :

Comme précisé précédemment, la concentration de spermatozoïdes mobiles, la concentration des spermatozoïdes immobiles et la fraction de spermatozoïdes mobiles sont déterminées à partir de l'analyse uniquement des 10 premières images sur les 30 afin de minimiser l'impact des collisions entre spermatozoïdes sur les résultats.

Les spermatozoïdes sont classés selon les mêmes recommandations que pour la méthode manuelle (**OMS, 2010**) :

- La mobilité progressive.
- La mobilité non progressive.
- La mobilité totale correspondant à la somme des 2 précédentes.
- Les spermatozoïdes immobiles.

La classification d'un spermatozoïde (spz) dans chaque catégorie de mobilité se fait à partir des paramètres cinétiques selon des cut-offs : des valeurs minimales de vitesse selon la trajectoire moyenne (VAP) et de rectitude (STR) pour la mobilité progressive et des valeurs

maximales de vitesse selon la trajectoire moyenne (VAP) et de vitesse en ligne droite (VSL) pour la mobilité non progressive et les immobiles.

Prenant pour exemple le logiciel CASA Hamilton Throne II Human clinical software qui utilise un code couleur spécifique pour chaque spermatozoïde selon les catégories décrites dans le tableau 4 ci-dessous.

Tableau 4 : Catégories de mobilité et code couleur (Lucie, 2019).

Catégorie	Description	Couleur
Mobile	Un spz qui bouge sur une distance supérieure à la longueur de sa tête à partir de sa position d'origine pendant l'acquisition.	Vert
Progressif	Un spz bougeant avec $STR > STR_p$ ET $VAP > VAP_p$.	Cyan
Lent	Un spz bougeant avec $VSL < VSL_{lent}$ OU $VAP < VAP_{lent}$.	Magenta
Statique	Un spz bougeant avec $VSL < VSL_{statique}$ OU $VAP < VAP_{statique}$.	Rouge
Franchit les limites	Quitte le champ pendant les 10 premières images.	Bleu foncé
Trajet tardif	Début de mouvement après les 10 premières images.	Jaune
Entrée tardive	Entre dans le champ après les 10 premières images.	Gris

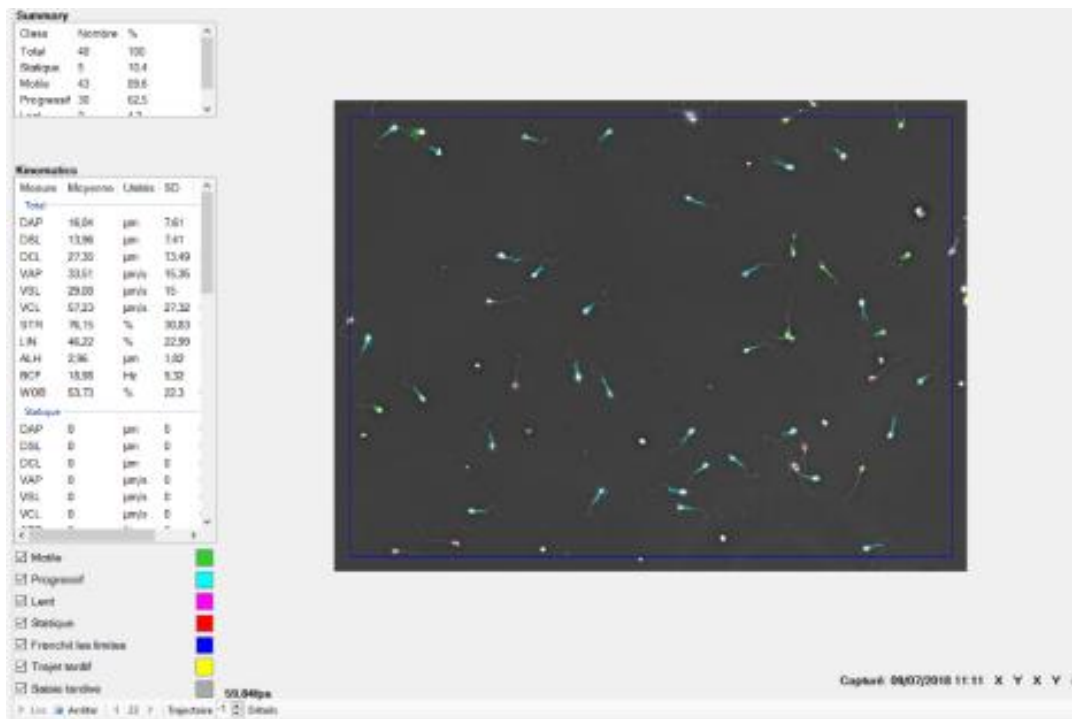


Figure 12 : Capture d'écran du logiciel : chaque spermatozoïde a sa trajectoire représentée avec la couleur correspondant à sa catégorie de mobilité (Post, 2019).

3.4 Facteurs influençant les résultats fournis par CASA :

Un facteur très important pour la standardisation des résultats du système CASA est la partie pré-analytique, qui comprend la préparation d'un échantillon pour analyse (Amann et Waberski, 2014). Ainsi, la vitesse de capture d'image du système CASA, la concentration, le volume d'échantillon, le type de chambre de comptage, la température et le type de dilueur sont essentiels pour une interprétation correcte des résultats CASA.

3.4.1 La vitesse de capture :

La fréquence de capture (FC) est définie comme étant le nombre d'images acquises par seconde lors de l'obtention de la trajectoire du sperme dans le CASA. La fréquence de capture dépend principalement de la qualité de la caméra et du standard d'imagerie appliqué (Mortimer, 2000). La fréquence de capture a un effet direct sur les trajectoires de mouvement des spermatozoïdes, ce qui peut encore affecter les résultats des paramètres de mouvement des spermatozoïdes. La trajectoire du mouvement des spermatozoïdes varie avec la FC. Lorsque la trajectoire est construite avec une FC de 30 Hz, elle sera relativement simple, alors qu'avec une FC de 60 Hz, elle sera relativement complexe.

3.4.2 Le type de cellule de comptage associé au système CASA :

Il existe différents modèles de systèmes CASA, et ces derniers sont souvent équipés de différentes cellules de comptage de spermatozoïdes. Cependant, les résultats fournis par CASA seront affectés en raison de la grande variation des résultats des différentes ces cellules de comptage (**Hu et al., 2006**). Même si le système CASA a une FC très élevé, un très bon système de traitement vidéo et un logiciel d'analyse avancé, si la profondeur de la chambre de comptage des spermatozoïdes présente une erreur importante, les résultats de la concentration et de la motilité des spermatozoïdes seront directement affectés.

Pour l'analyse du mouvement, des chambres jetables (plusieurs fabricants), chargées par capillarité, avec une profondeur soigneusement contrôlée de 20 ou 10 μm sont souvent recommandées. Ces profondeurs font qu'il est moins probable qu'un spermatozoïde puisse remonter et / ou descendre en dehors de la profondeur de champ utile du microscope (**Rikmenspoel, 1984**).

3.4.3 Les algorithmes du système CASA :

Une trajectoire irrégulière du mouvement des spermatozoïdes produira une forme et une complexité assez différentes de la trajectoire de mouvement des spermatozoïdes lorsque la FC varie. Il est donc nécessaire de traiter ces pistes en utilisant certains principes et algorithmes. En général, les valeurs des paramètres cinétiques des spermatozoïdes, tels que VAP, ALH, etc., sont calculées par les algorithmes après le lissage de la trajectoire des spermatozoïdes (**Mortimer et Swan, 1999**). Par conséquent, si les algorithmes sont différents entre les systèmes CASA, les résultats manqueront de comparabilité.

3.4.4 La concentration spermatique de l'échantillon :

L'effet de la concentration spermatique sur la motilité et les paramètres cinétiques des spermatozoïdes était très évident lorsqu'il a été évalué avec le système CASA. **Johnson et collaborateurs (1996)** ont rapporté que le système CASA (Hamilton-Thorne) affilié à la chambre Micro Cell pouvait détecter la concentration et la motilité des spermatozoïdes avec précision dans un intervalle de concentration de spermatozoïdes de $20 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$ à $149 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$. Cependant, **Wetzels et al. (1993)** ont observé l'effet de la concentration de spermatozoïdes sur les résultats du système CASA en utilisant différentes dilutions d'échantillons de sperme et ont

constaté que tous les paramètres de motilité des spermatozoïdes étaient affectés par la concentration dans un intervalle de $10 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$ à $180 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$.

Spiropoulos (2001) a montré qu'il y avait des différences significatives dans les paramètres de mouvement des spermatozoïdes entre les échantillons à concentration de sperme faible et élevée après l'analyse des échantillons de sperme dilués avec le système CASA, ce qui indique qu'une concentration élevée de spermatozoïdes peut fausser les résultats du comptage, de la motilité et des paramètres cinétiques des spermatozoïdes. De plus, le manuel de l'OMS (**2010**) recommande que la concentration de sperme dans les échantillons de sperme détectés avec le système CASA soit inférieure à $50 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$, et Mortimer (**2000**) recommande même qu'elle soit moins de $40 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$.

3.4.5 Standardisation et mesures de contrôle qualité pour CASA :

Le facteur humain peut également affecter les résultats de l'analyse de différentes manières, des exigences spécifiques doivent donc être remplies. Le technicien de laboratoire joue un rôle crucial dans ces conditions complexes d'évaluation et peut influencer la quasi-totalité des facteurs susmentionnés, afin de garder les résultats obtenus fiables et reproductibles (**Michos et al., 2013, Amann et Waberski., 2014**). Par conséquent, CASA, en tant que système sophistiqué, impose des exigences élevées aux opérateurs qualifiés. De plus, comme il n'y a pas de norme d'or définie pour les méthodes d'analyse de la motilité des spermatozoïdes animaux, il est donc recommandé d'établir un mode opératoire standard pour un laboratoire spécifique (**Feitsma et al., 2011**). L'achat et la création de CASA impliquent non seulement l'entretien des installations, mais les opérateurs doivent connaître les principes de CASA et doivent être formés périodiquement (**Michos et al., 2013**).

3.5 Autres applications :

Le système CASA peut également être utilisé pour évaluer les changements des paramètres de mouvement des spermatozoïdes avant et après la décongélation (**Liu et al., 2004**), les effets de différents milieux ou du traitement *in vitro* sur la fonction du sperme (**Amann & Katz, 2004**), ainsi que la relation entre les paramètres de mouvement des spermatozoïdes, tels que la VCL, la VAP, l'ALH, etc., et l'augmentation de la viscosité du sperme ou l'asthénospermie (**Elzanaty et al., 2004**). **Fetterolf et Rogers (1990)** ont constaté que les résultats du test de pénétration du sperme (SPA) étaient fortement corrélés avec la concentration du sperme, la motilité, la VCL et le BCF, et pensaient que le SPA très gênant et

chronophage pourrait être remplacé par le CASA. Surtout, la technologie CASA peut-être utilisée pour identifier les différences subtiles dans la qualité du sperme. De plus, CASA est utile lors d'analyses des échantillons de taille importantes pour les enquêtes épidémiologiques sur le sperme.

Conclusion

Le lapin mâle joue un rôle très important dans la réussite et dans la rentabilité d'un élevage cunicole car il influence la fertilité et la prolificité d'environ 8 à 11 lapines lorsqu'on pratique une saillie naturelle (**Roca, 1994 ; Osechas et Becerra, 2006**) et 100 lapines lorsqu'on pratique une insémination artificielle (**Eid, 2008**).

L'analyse du sperme de lapin est une évaluation descriptive des propriétés fertilisantes des spermatozoïdes. L'évaluation conventionnelle de la qualité du sperme frais comprend usuellement les paramètres suivants : l'évaluation macroscopique qui comprend l'analyse de la couleur du volume et du PH, et l'analyse microscopique qui concerne la motilité massale et individuelle, la concentration, la morphologie, la viabilité, l'intégrité de la membrane acosmique et l'évaluation de la maturation et la capacitation des spermatozoïdes.

Le besoin d'une analyse rapide, objective et fiable des différents paramètres spermatiques a conduit au développement de systèmes semi-automatisés pour l'analyse du sperme (CASA), qui sont aujourd'hui de plus en plus utilisés en routine pour évaluer les caractéristiques du sperme.

Le développement du système CASA pour analyser les paramètres de fonctionnalité cinématiques ainsi que la motilité et la concentration des spermatozoïdes, est d'une importance primordiale pour évaluer les caractéristiques et la fertilité des spermatozoïdes dans le détail et d'une façon objective en surmontant la variabilité

En quelques secondes, des centaines à des milliers de spermatozoïdes peuvent être analysés avec une grande précision, ce qui permet de faciliter l'étude de la qualité spermatique du lapin afin de permettre la sélection des mâles avec la meilleure semence pour garantir une meilleure progéniture.



REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

Alvarino, J.M.R., 1993. Control de la reproducción en el conejo. Edit. MAPAMundiprensa, Madrid, pp. 137.

Alvariño, J.M.R., 2000. Reproductive performance of male rabbits. In Proc. 7th World Rabbit Congress, July 2000, Valencia, Spain, Vol. A, 13-35.

Amann, RP., Katz, DF., 2004. Reflections on CASA after 25 years. *J Androl* 25 :317–325.

Amann, RP., Lambiase, J.T., 1967. The male rabbit. I. Changes in semen characteristics and sperm output between puberty and one year of age. *J. Reprod. Fert.*, 14:329-332.

Amann, RP., Waberski, D., 2014. Computer-assisted sperm analysis (CASA): Capabilities and potential developments. *Theriogenology*81(1):5–17. e1–3.

Apel-Paz, M., Vanderlick, TK., Chandra, N., Doncel, GF., 2003. A hierarchy of lipid constructs for the sperm plasma membrane. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 309: 724-32. PMID 13679032 DOI: 10.1016/J.Bbrc.2003.08.065

Arencibia, A. D.F., Rosario, F. L.A., 2009. Consideraciones prácticas acerca de la calidad del semen de Conejos aplicado en estudios de toxicología de la fertilidad. *REDVET Revista Electronica Veterinaria*, 8 (10) :1-18.

Arriola, J., Foote, R. H., 2001, Accessory Sperm as an Indication of Fertilizing Ability of Rabbit Spermatozoa Frozen in Egg Yolk–Acetamide with Detergent.

Arroita, Z., Falceto, M.V., Martín Rillo, S., De Alba, C., Moreno, C., Ciudad, M.J., Rafel, O., 2000. Effect of collection frequency on production, quality and storage of young bucks semen. 7th World Rabbit Congress, 4-7 Juillet, Valencia (Spain), 6 p

B

Baril, G., Chemineau, P., Cognie, Y., Guérin, Y., Leboeuf, B., Orgeur, P., Vallet, J-C., 1993. Manuel de formation pour l'insémination artificielle.

Barone, R., 2001. Anatomie comparée des mammifères domestiques. Tome 4: Splanchnologie II, Ed. Vigot, 920 p.

Bencheikh, N., 1995. Effet de la fréquence de la collecte de la semence sur les caractéristiques du sperme et des spermatozoïdes récoltés chez le lapin, *Ann Zootech* 44, 263-274.

Besenfelder, U., Theau-Clément, M., Sabbioni, E., Castellini, C., Renieri, t., Havlicek, V., Huber, T., Wetscher, F., Mösslacher, G., Brem, G., 2004. Effects of different light intensities on quality of spermatozoa in rabbits, world rabbit sci. 2004, 12: 227 – 234.

Bodnar, K., Torok, I., Hejel, P., Bodnar, E., 1996. Preliminary study on the effect of ejaculation frequency on some characteristics of rabbit semen. 6th World Rabbit Congress, Toulouse (France), 2: 41-44.

Boiti, C., Castellini, C., Theau-Clément, M., Besenfelder, U., Liguori, L., Renieri, T. et Pizz, F., 2005. Guidelines for the handling of rabbit bucks and semen, world rabbit sci., 13: 71 – 91.

Bonnes, G., Desclaude, J., Drogoul, C., Gadoud, R., Jussiau, R., Le Loc'h, A., Montméas, L., Robin, G., 2005. Reproduction des animaux d'élevage. 2ème éd., Ed. Educagri, 407 p.

Boussit, D., 1989. Reproduction et insémination artificielle en cuniculture chez le lapin. Edité par l'association française de cuniculture : diffusion Lavoisier TEC et DOC.

Brewer, N.R., 2006. Historical Special Topic Overview on Rabbit Comparative Biology: Biology of the Rabbit. Journal of American Association, 45, 8-24.

Bunaciu, P., Cimpeanu, I., Bunaciu, M., 1996. Mating frequency effect on spermatogenesis and performance of breeding rabbits. 6th World Rabbit Congress, Toulouse (France), 2: 51-54.

C

Cabannes, C.R., 2008. Comparaison des méthodes d'évaluation de la qualité de la semence dans l'espèce bovine, canine et humaine. Thèse de doctorat Vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, 107 p.

Castellini, C., 1996. Recent advances in rabbit artificial insemination. 6th World Rabbit Congress, Toulouse (France), 2: 13-26.

Castellini, C., 2008. Semen production and management of rabbit bucks, 9th World Rabbit Congress – June 10-13, Verona – Italy.

D

Derivaux, J. 1971. Reproduction chez les animaux domestiques : Tome 1 et Tome 2. Liège : Edit. Dérouaux. – 157-171p.

Douglas-Hamilton, DH., Smith, NG., Kuster, CE., Vermeiden, JPW., Althouse, GC., 2005. Capillary-Loaded Particle Fluid Dynamics: Effect on Estimation of Sperm Concentration. J Androl, 115–22.

E

Espinosa, E., Josa, A., Vilorio, A., 2009. Fisiología de la reproducción en el conejo. 135/139.

Elzanaty, S., Malm, J., Giwercman, A., 2004. Visco-elasticity of seminal fluid in relation to the epididymal and accessory sex gland function and its impact on sperm motility. *Int J Androl* 27:94–100.

Eid, Y.Z., 2008. Dietary grape pomace affects lipid peroxidation and anti oxidative status in rabbit semen. *World Rabbit Science*, 16 : 157-164.

F

Feitsma, H., Broekhuijse, M.L., Gadella, B.M., 2011. Do CASA systems satisfy consumers demands? A critical analysis. *Reprod. Domest. Anim.* 46, 49–51.

Finzi, A., 1990. Recherches pour la sélection de souches de lapins thermo tolérants. *Options méditerranéennes, série A "Séminaires méditerranéens"*, N° 8, p. 41-45.

Finzi, A., Morera, P., Kuzminsky, G., 1995. Sperm abnormalities as possible indicators of rabbit chronic heat stress. *World Rabbit Science*, 3 (4): 157-161.

Finzi, A., Morera, P., Macchioni, P., 1994. Modifications of some rabbit spermatid parameters in relationship to high ambient temperatures. *Options méditerranéennes, série A "Séminaires méditerranéens"*, N° 8, p. 333-336.

G

García Tomás, M., Sánchez, J., Rafel, O., Ramon, J., Piles, M., 2006a. Heterosis, direct and maternal genetic effects on semen quality traits of rabbits. *Livestock Science*, 100 : 111-120.

García, M.L., Andrés, I., Caselles, P., Lavara, R., 2004. Estudio de la edad de los machos de conejo en la inseminación artificial. *Boletín de cunicultura*, N° 132. Mars-Avril, p. 17-25.

Garrett, C., Liu, D.Y., Clarke, G.N., Rushford, D.D., Baker, H.W.G., 2003. Automated semen analysis: "zona pellucida preferred" sperm morphometry and straight-line velocity are related to pregnancy rate in subfertile couples. *Hum Reprod.* 16:43–9.

Gogol, P., Bochenek, M., Smorag, Z., 2002. Effect of rabbit age on sperm chromatin structure. *Reprod. Dom. Anim*, 37: 92- 95

H

Hanzen, c., 2009-2010. Rappels anatomophysiologiques relatifs à la reproduction du taureau. ORBI. Université de Liège, 8 P.

Holtz, W., Foote, R.H., 1978. The Anatomy of the Reproductive System in Male Dutch Rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) with special emphasis on the accessory sex glands. *J. Morph.*, 158: 1-20.

Hu, YA., Lu, JC., Lu, NQ., Shao, Y., Huang, YF., 2006. Comparison of four methods for sperm counting. *Zhonghua Nan Ke Xue* 12:222–224, 227.

J

Johnston, S. D., Root Kustriz, M. V., & Olson, P. N. S., 2001a. Semen Collection, Evaluation, and Préservation. In: Johnston S.D. (eds.). *Canine and feline theriogenology*. W.B. Saunders Company, Philadelphia, 287- 306.

Joly, T., Theau-Clément, M., 2000. Reproduction et physiologie de la reproduction au *7ème Congrès Mondial de Cuniculture*. **A.S.F.C.** Journée du 5 Décembre 2000, Valencia 2000 "Ombres et lumières", thème "Reproduction", p. 19-24.

K

Kasa, I.W., Thwaites, C.J., 1992. Semen quality in bucks exposed to 34°C for 8 hours or either 1 or 5 days. *J. Appl. Rabbit. Res.*, 15: 560-586.

L

Lavara, R., Vicente, J. S., Marco-Jiménez, F., Baselga, M., 2008. Correlation between CASA and ASMA parameters in rabbit semen. 9th World Rabbit Congress– June 10-13, 2008, Verona – Italy, p. 381-385.

Lebas F., 2009. Biologie du lapin. <http://www.cuniculture.info/Docs/indexbiol.htm>. (Accès le : 20/12/2021)

Liu, M., Deng, S., Ma, C., Chen, A., Jiang, Y., Wen, R., Wang, Q., nTang, L., Huang, J., Yao, X., 2004. Comparison of sperm motion parameters in pre-freeze and post-thaw semen samples using computer-assisted sperm analysis. *Zhonghua Nan Ke Xue* 10 : 431–433.

López, J., Alvarino, J.M.R., Del Arco, J.A., Bueno, A., Sanz, C., 1996. Effect of male rabbit management on semen production. 6th World rabbit congress, Toulouse (France), 2: 83-86.

Lucie, P., 2019. Validation de méthode du CASA (Computer-Aided Sperm Analysis) Hamilton ThorneCEROS II pour son application en routine dans un laboratoire de spermologie (Thèse) : Médecine humaine et pathologie. THÈSE SOUTENUE PUBLIQUEMENT À LA FACULTÉ DE MÉDECINE DE GRENOBLE Le 11/10/2019, 126p.

Luzi, F., Maertens, L., Mijten, P., Pizzi, F., 1996. Effect of feeding level and dietary protein content on libido and semen characteristics of bucks. 6 World Rabbit Congress, Toulouse (France), p 87-92.

M

Manuel d'Hamilton Thorne :<https://www.hamiltonthorne.com> (Accès le 01/06/2022).

Michele Di Iorio., 2014. Cryopreservation of rabbit semen: effectiveness of different permeable and non-permeable cryoprotectants on post-thaw sperm quality and reproductive performances. Doctorate Thesis. University of Molise Department of Agricultural, Environmental and Food Sciences.132p.

Michos, I. A., Basioura, A. G., Boscós, C. M., Tsakmakidis, I. A., 2013. Proper use and impact of Computer Assisted Semen Analysis' technique on semen evaluation of farm animals. Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society 64 (4): 267-74.

Mocé, E., Lavara, R., Lavara, F., Vicente, J.S., 2000a. Effect of reproductive rhythm on seminal parameters from a rabbit line with high growth rate. 7th World Rabbit Congress, 4-7 Juillet, Valencia (Spain), 6 p

Morrell, J.M., 1995. Artificial insemination in rabbits. British Veterinary Journal,151 (5) : 477-488.

Mortimer, D., Serres, C., Mortimer, ST., Jouannet., P., 1988. Influence of image sampling frequency on the perceived movement characteristics of progressively motile human spermatozoa. Gamete Res.313–27.

Mortimer, ST., 2000. CASA – Practical Aspects. J Androl. 2000.

Mortimer, ST., Swan, MA., 1999. The development of smoothing-independent kinematic measures of capacitating human sperm movement. Hum Reprod 14:986–996.

N

Nizza, A., Di Meo, C., Taranto, S.,2003. Effect of collection rhythms and season on rabbit semen production. Reprod. Dom. Anim., 38: 436-439.

O

Osechas, D., Becerra, M.S., 2006. Producción y mercadeo de carne de conejo en el estado trujillo, Venezuela. Revista Científica, FCV-LUZ, 16 (2) : 129-135

P

Posière, S.C.G.J., 2002. Récolte de la semence de chat (*Felis catus*) par électro-éjaculation et par dissection de l'épididyme (comparaison des méthodes, essai de cryoconservation avec un dilueur canin). Thèse de Doctorat Vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, 95 p.

R

Raphaël, B., Maud, B., Pierre, B., Pierrick, H., Catherine, J L., Gérard, J M., Elise, M., René, R., Luc, J.J.R., 2004. Projet cryoyster : optimisation, standardisation et validation de la congélation de laitance d'huitre creuse *crassostrea gigas* à des fins de conservation et de diffusion génétique.

Rikmenspoel, R., 1984. Movements and active moments of bull sperm flagella as a function of temperature and viscosity. *J Exp Biol* 1984 ; 108 :205–30.

Roca, T., 1994. Rentabilidad de la explotacion del conejo de monte. *Boletin de cunicultura*, N° 71, p. 37-42.

S

Sabbagh, M., 1983. « Etude de la sexualité et de la reproduction du lapin domestique *Oryctolagus cuniculus* à des températures, le comportement alimentaire et fonctionnement thyroïdien et surrénalien en période d'adaptation au stress thermique ». Thèse de doctorat. Université de Dakar Ecole Inter –état des Science Et médecine Vétérinaire. p12-50.

Soler, C., Yeung, C.H., Cooper, T.G., 1994. Development of sperm motility patterns in the murine epididymis. *Int J Androl*, 1994. 17(5) : p. 271-8.

Suarez, S. S., and Pacey, A. A. (2006). Sperm transport in the female reproductive tract. *Hum. Reprod. Update* 12, 23–37. doi:10.1093/HUMUPD/DMI047

T

Theau-Clement, M., Sanchez, A., Duzert, R., Saleil, G., Brun, G.M., 2009, Etudes des facteurs de variation de la production spermatique chez le lapin.

V

Van der Horst, G., Plessis, S.S., 2017. Not just the marriage of Figaro: but the marriage of WHO/ESHRE semen analysis criteria with sperm functionality. *Postępy Andrologii Online*, 4(1), 6- 21.

W

World Health Organization., 2010. WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen, 5th edition. Geneva : WHO Press.