

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA

RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE SAAD DAHLAB - BLIDA 1



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Biologie

Mémoire de fin d'études

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

Filière Sciences Biologiques

Option : BPR

Thème

**EVALUATION DES PARAMETRES MORPHOMETRIQUES DES SPERMATOZOÏDES
CANINS « COMPARAISON DE LA MICROSCOPIE ET LE SYSTEME HT-IVOS II »**

Présenté par :

Date de soutenance : 27/07/2022

BOUGUETOF CHAOUKI

Devant le jury :

<u>Nom</u>	<u>Grade/ Lieu</u>	<u>Qualité</u>
Mr BESSAAD A.	MCA/USDB1	Président (e)
Mme BENAZOUZ F.	MAA/USDB1	Examinatrice
Mr R.BELALA	MCA/ USDB1	Promoteur

Promotion : 2021-2022

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je tiens à remercier Dieu le tout puissant et le miséricordieux, De m'avoir donné la santé, la volonté et la patience pour mener à réaliser ce mémoire.

La réalisation de ce mémoire a été possible grâce au concours de plusieurs personnes à qui je voudrais témoigner toute ma gratitude.

Je voudrais dans un premier temps remercier, mon directeur de mémoire **R.BELALA**, pour sa patience, sa disponibilité et surtout ses judicieux conseils, qui ont contribué à alimenter ma réflexion.

Je remercie également toute l'équipe de la plateforme Biotechnologique en Reproduction des Carnivores (**PBRC**) de l'université de Blida1.pour avoir assuré la partie expérimentale de celle-ci.

Je tiens à remercier spécialement : Mlle MEDJKOUNE.M, pour son aide précieuse au cours de ce travail et sa gentillesse.

Enfin, je remercie mes amis les vétérinaires de la **DGSN** : KESKAS.F, DRIAS.B, AICHE.A et ARKOUB.K qui ont toujours été là pour moi. Leur soutien inconditionnel et leurs encouragements ont été d'une grande aide.

À tous ces intervenants, je présente mes remerciements, mon respect et ma
gratitude.

DEDICACES

Aux personnes qui me sont les plus chères au monde

Mes parents à qui je dois d'être là et à qui je dois

Mon éducation et ma réussite

A ma petite famille :

Ma femme .W. Mon garçon **MATINE** ; Mes filles

MAYSSEM et KADAR

A mon frère et mes sœurs



RESUME

Le présent travail consiste en une évaluation de l'effet de deux paramètres de détection cellulaire (seuil minimum de brillance « HBM » et de surface de la tête du spermatozoïde « AREA ») sur l'analyse morphométrique automatique des spermatozoïdes canins par le système HT-IVOS II. Vingt éjaculats ont été récoltés à partir de 6 chiens et la morphologie des spermatozoïdes a été analysée par technique conventionnelle (Microscopie) et par le système HT-IVOS II dans deux situations différentes (spermatozoïdes mobiles et statiques). Les 20 vidéos enregistrées à partir de l'analyse des 20 éjaculats ont été réanalysées en modifiant les deux paramètres du setup étudiés selon un protocole d'optimisation qui a permis l'obtention de 1120 analyse IVOS II. L'analyse statistique a été effectuée par le logiciel IBM-SPSS. Les résultats suggèrent un effet très significatif du facteur HBM sur les taux de normozoospermie et térazozoospermie, par contre le facteur AREA n'a pas d'effet significatif sauf pour les valeurs extrêmes (14- 16 μm^2). Une HBM de 140 et une AREA entre 4-10 μm^2 semblent être le paramétrage de détection cellulaire le plus adapté à la morphométrie automatique par le système HT-IVOS II. Un mauvais paramétrage de la brillance minimale de la tête du spermatozoïde (HBM) pourrait induire des artefacts de contraste conduisant à une surestimation de l'anomalie majeure de gouttelette proximale.

Mot clés : Chien – Semence – CASA (HT-IVOS II) – Morphologie classique – Morphométrie automatique.

ملخص

يتكون العمل الحالي من تقييم لتأثير معلمتين للكشف عن الخلايا (الحد الأدنى للسطوح HBM و سطح رأس الحيوان المنوي AREA) على التحليل المورفومتري التلقائي للحيوانات المنوية للكلاب بواسطة نظام HT-IVOS II. تم جمع عشرين قذفة من 6 كلاب وتم تحليل مورفولوجيا الحيوانات المنوية بالتقنية التقليدية (الفحص المجهرى) ونظام HT-IVOS II في حالتين مختلفتين (الحيوانات المنوية المتحركة والثابتة). تم إعادة تحليل 20 مقطع فيديو تم تسجيلها من تحليل القذف العشرين عن طريق تعديل المعلمتين للإعداد المدروس وفقاً لبروتوكول التحسين الذي جعل من الممكن الحصول على 1120 تحليل IVOS II. تم إجراء التحليل الإحصائي باستخدام برنامج IBM-SPSS. تشير النتائج إلى وجود تأثير كبير جداً لعامل HBM على معدلات النطاف الطبيعي و tératozoospermie ، من ناحية أخرى ، فإن عامل AREA ليس له تأثير كبير باستثناء القيم القصوى (14-16 ميكرومتر). يبدو أن HBM من 140 والمساحة بين 4-10 ميكرومتر مربع هي أنسب إعداد للكشف عن الخلايا لقياس التشكل التلقائي بواسطة نظام HT-IVOS II. يمكن أن تؤدي المعلمات غير الصحيحة للحد الأدنى من سطوح رأس الحيوانات المنوية (HBM) إلى تحفيز التباين مما يؤدي إلى المبالغة في تقدير شذوذ القطيرات القريب الرئيسي.

الكلمات المفتاحية : الكلب - السائل المنوي - HT-IVOS II CASA - التشكل الكلاسيكي -

قياس التشكل الآلي.

ABSTRACT

The present work consists of an evaluation of the effect of two cell detection parameters (minimum threshold of brightness HBM and surface of the head of the spermatozoon **AREA**) on the automatic morphometric analysis of canine spermatozoa by the system HT-IVOS II. Twenty ejaculates were collected from 6 dogs and the morphology of the spermatozoa was analyzed by conventional technique (microscopy) and by the HT-IVOS II system in two different situations (motile and static spermatozoa). The 20 videos recorded from the analysis of the 20 ejaculates were reanalyzed by modifying the two parameters of the setup studied according to an optimization protocol which made it possible to obtain 1120 IVOS II analyses. Statistical analysis was performed using IBM-SPSS software. The results suggest a very significant effect of the HBM factor on the rates of normozoospermia and teratozoospermia, on the other hand the AREA factor has no significant effect except for the extreme values (14-16 μm^2). An HBM of 140 and an AREA between 4-10 μm^2 seem to be the most suitable cell detection setting for automatic morphometry by the HT-IVOS II system. Improper parameterization of the minimum sperm head brightness (HBM) could induce contrast artifacts leading to an overestimation of the major proximal droplet anomaly.

Keywords: Dog – Semen – CASA HT-IVOS II – Classic morphology – Automatic morphometry.

SOMMAIRE

I- INTRODUCTION	1
CHAPITRE 01 : Rappel anatomo-physiologique de l'appareil génital mâle....	3
1.1 Les testicules et les voies spermatiques.....	3
1.2. Pénis.....	8
1.3. Les glandes accessoires.....	10
1.4. Physiologie sexuelle du chien mâle.....	11
CHAPITRE 02 : La semence canine.....	13
2.1. Composition de la semence canine.....	13
2.2. Récolte de la semence canine.....	15
2.3. Le spermatozoïde canin.....	19
2.3.1. Définition.....	19
2.3.2. Structure.....	19
2.4. Les anomalies.....	21
2.5. Examen du sperme canin.....	23
2.5.1. Le spermogramme.....	23
2.5.2. Le spermocytogramme.....	26
2.5.3 Technique CASA (Analyse Spermatique Assisté par Ordinateur).....	29
CHAPITRE 03 : Analyse de la morphologie du spermatozoïde canin.....	32
3.1. Introduction.....	32
3.2. Analyse conventionnelle.....	32
3.2. 1. Spermocytogramme.....	32
3.3. Analyse informatisé système CASA.....	35
3.3.1 Paramètres étudiés avec CASA.....	37
PARTIE EXPERIMENTALE	
III- MATERIELS ET METHODES.....	44

1. Lieux d'expérience.....	44
2. MATERIELS.....	44
2.1. Matériel Biologique.....	44
2.2 Matériel divers.....	45
3. METHODES.....	50
3.1. Récolte de la semence.....	50
3.2. Evaluation initiale de la semence.....	52
3.3. Dilution de la semence.....	53
3.4. Préparation de la lame pour l'étude morphologie conventionnelle.....	54
3.5. Technique de coloration (Diff-quick®).....	55
3.6 Montage et conservation des lames.....	56
3.7. La lecture au microscope optique.....	56
3.8. Analyse spermatique par le système HT-IVOS II®.....	56
3.8.1. Description.....	58
4. Protocole expérimental.....	58
5. Saisie des donnés.....	59
5. Analyse statistique.....	59
IV- RESULTATS.....	60
V- DISCUSSION.....	72
CONCLUSION.....	80
RECOMMANDATIONS.....	81
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	82
ANNEXES.....	89

LISTES DES FIGURE

Figure n°01: coupe longitudinale d'un testicule.	4
Figure n°02 : Organisation interne du testicule et fonction endocrine	6
Figure n°03 : Les différentes étapes de la spermatogenèse	7
Figure n°04 : L'appareil génital mâle	9
Figure n°05 : les trois phases de l'éjaculat du chien	14
Figure n°06: Matériel nécessaire à la récolte du sperme chez le chien.	16
Figure n°07 : début de la récolte.	18
Figure n°08: soulèvement d'un postérieur	18
Figure n°09: orientation caudale du pénis	18
Figure n°10 : Structure du spermatozoïde.	19
Figure n°11 : L'ultra structure du spermatozoïde	20
Figure n°12: Principales anomalies morphologiques majeures et mineures.	22
Figure n° 13: sperme de forme normal	34
Figure n°14: Equipement pour L'analyse Spermatique assistée par ordinateur, HamilltonThorn IVOS II	36
Figure n°15: Les principales mesures cinématiques impliquées dans le suivi des spermatozoïdes	41
Figure n°16: la Plateforme (PBRC) de l'université de Blida1.	44
Figure n°17: photos des chiens inclus dans la partie expérimentale	45
Figure n°18: Matériel de récolte de semence canine et Bain marie à 37°C	46
Figure n°19: Photomètre calibré de marque SDM1 MINITUB	46
Figure n°20: microscope optique de marque NIKON E100 à platine chauffante	47
Figure n°21: lame d'analyse LEJA ® à 4chambres de 20µm.	47
Figure n°22: L'analyseur Hamilton-Thorne IVOS II	48
Figure n°23: présentation du microscope et camera intégrée de L'analyseur Hamilton-Thorne IVOS II	48
Figure n°24: microscope optique de marque OPTIKA	49
Figure n°25: matérielles de montage	49
Figure n°26: défèrent matérielles utilisé pour l'analyse de la semence	50
Figure n°27: la récolte de sperme chez le chien	51
Figure n°28: Les trois différentes fractions spermatiques recueillies chez le chien	51
Figure n°29: Dépôt d'une goutte de semence sur une lame pour évaluation	52
Figure n°30: Le photomètre SDM1, Mini tub	53
Figure n°31 : Easy buffer (solution commerciale)	54
Figure n°32: identification de la lame	54
Figure N°33: agitation de l'échantillon	54
Figure n°34: dépose la goutte sur la lame	55
Figure n°35 : étalement de la goutte sur la surface de la lame	55
Figure n°36: les différentes solutions Diff-Quik	56
Figure n°37: paramètres pise par le système CASA IVOS II	58

- Figure n° 38:** Effet de variation « 100-200 » de la brillance minimale « HBM » sur le taux de normozoospermie des spz canins analysés par le système HT-IVOS II avec Area fixée à $16\mu\text{m}^2$. 60
- Figure n°39 :** Effet de variation « 100-200 » de la brillance minimale « HBM » sur le taux de térazozoospermie des spz canins analysés par le système HT-IVOS II avec Area fixée à $16\mu\text{m}^2$ 61
- Figure n°40 :** Effet de variation « 100-200 » de la brillance minimale « HBM » et « Area » fixée à $16\mu\text{m}^2$ sur le taux des spz canins présentant une Gouttelette Proximale (PD, proximal Droplet) après analyse par le système HT-IVOS II. 62
- Figure n° 41 :** Effet de variation « 100-200 » de la brillance minimale « HBM » et « Area » fixée à $16\mu\text{m}^2$ sur le taux des spz canins présentant un Flagelle enroulé (CT, CoiledTail) après analyse par le système HT-IVOS II 63
- Figure n°42 :** Effet de variation « 2-16, μm^2 » de la taille minimale du spz « AREA » avec la brillance minimale « HBM » fixée à 187 sur le taux de normozoospermie des spz canin analysés par le système HT-IVOS 64
- Figure n°43 :** Effet de variation « 2-16, μm^2 » de la taille minimale du spz « AREA » avec la brillance minimale « HBM » fixée à 187 sur le taux de térazozoospermie des spz canin analysés par le système HT-IVOS II. 65
- Figure n°44 :** Effet de variation « 2-16, μm^2 » de la taille minimale de la tête du spz « AREA » et HBM fixé à $140\mu\text{m}^2$ sur le taux des spz canins présentant un Flagelle enroulé (CT, CoiledTail) après analyse par le système HT-IVOS 66
- Figure n°45 :** Droite de régression linéaire entre le taux de normozoospermie des spz canins évalué par la microscopie classique et le système HT-IVOS II et le paramétrage A : « HBM : 187 ; AREA : $16\mu\text{m}^2$; $R=-0.347$; $p=0.134$; $n=20$ » et B : « HBM : 140 ; AREA : $4\mu\text{m}^2$; $R= +0.393$; $p=0.134$; $n=20$ ». 67
- Figure n°46 :** Droite de régression linéaire entre le taux de Flagelle Enroulé (PD) des spz canins évalué par la microscopie classique et le système HT-IVOS II et le paramétrage C : « HBM : 187 ; AREA : $16\mu\text{m}^2$; $R= -0.354$; $p=0.126$; $n=20$ » et D : « HBM : 140 ; AREA : $4\mu\text{m}^2$; $R= +0.331$; $p=0.154$; $n=20$ ». 68
- Figure n°47 :** Concentration analysée par le système HT-IVOS II avec plusieurs paramétrages avec spz mobile (1) et immobilisés avant analyse (2). 69
- Figure n°48 :** Droite de régression linéaire entre la concentration des spz canins évalué par numération cellulaire (Neubauer) et le système HT-IVOS II avec différents paramétrages. 69

LISTE DES TABLAUX

Tableau n°01: Description des trois phases de l'éjaculat du chien	14
Tableau n°02: Echelle d'appréciation de la motilité massale du sperme du chien	24
Tableau n°03: Classification des anomalies du spermatozoïde de chien	28
Tableau n°04: Définitions des trajectoires des spermatozoïdes d'après	40
Tableau n°05: identification de chaque animal	44
Tableau n°06 : Taux moyens de normozoospermie de 20éjaculats canins analysés par le système HT-IVOS II à plusieurs valeurs « 100-200 » de brillance minimale de la tête du spz « HBM » et à une « Area » fixée à $16\mu\text{m}^2$ (n=20).	60
Tableau n° 07 : Taux moyens de tératozoospermie de 20éjaculats canins analysés par le système HT-IVOS II à plusieurs valeurs « 100-200 » de brillance minimale de la tête du spz « HBM » et à une « Area » fixée à $16\mu\text{m}^2$ (n=20).	61
Tableau 08 : Taux moyens de Gouttelette Proximale (PD, proximal Droplet) de 20éjaculats canins analysés par le système HT-IVOS II à plusieurs valeurs « 100-200 » de brillance minimale de la tête du spz « HBM » et à une « Area » fixée à $16\mu\text{m}^2$ (n=20).	62
Tableau 09: Taux moyens de Flagelle enroulé (CT, CoiledTail) de 20éjaculats canins analysés par le système HT-IVOS II à plusieurs valeurs « 100-200 » de brillance minimale de la tête du spz « HBM » et à une « Area » fixée à $16\mu\text{m}^2$ (n=20).	63
Tableau n°10 : Taux moyens de normozoospermie de 20 éjaculats canins analysés par le système HT-IVOS II à plusieurs valeurs « 2-16, μm^2 » de taille minimale de la taille du spz « AREA » et à une brillance minimale « HBM » fixée à 187(n=20).	64
Tableau n°11: Taux moyens de tératozoospermie de 20 éjaculats canins analysés par le système HT-IVOS II à plusieurs valeurs « 2-16, μm^2 » de taille minimale de la taille du spz « AREA » et à une brillance minimale « HBM » fixée à 187 (n=20).	65
Tableau n°12: Taux moyens de Flagelle enroulé (CT, CoiledTail) de 20 éjaculats canins analysés par le système HT-IVOS II à plusieurs valeurs « 2-16, μm^2 » de taille minimale de la taille du spz « AREA » et à une brillance minimale « HBM » fixée à 187 (n=20).	66

Tableau 13: Concentration analysée par le système HT-IVOS II avec plusieurs paramétrages avec spz mobile (1) et immobilisés avant analyse (2) (n=1120).	68
Tableau n°14: Tableau des corrélations entre les concentrations mesurées par numération cellulaire « Neubauer » et par le système HT-IVOS II avec plusieurs paramétrages (HBM187-AREA16 ; HBM140-AREA4) avec spz mobile (MOB) et immobilisés avant analyse (STAT) (n=20).	70
Tableau n°15: Moyennes de concentrations mesurées par numération à la cellule de Neubauer « CONC.NB » et par le système HT-IVOS II avec plusieurs paramétrages (HBM187-AREA16 ; HBM140-AREA4) avec spz mobile (MOB) et immobilisés avant analyse (STAT) (n=20).	70
Tableau n°16 : Moyennes de normozoospermie analysés par microscopie « TOTAL.NORM.MIC » et par le système HT-IVOS II avec plusieurs paramétrages (HBM187-AREA16 ; HBM140-AREA4) avec spz mobile (MOB) et immobilisés avant analyse (STAT) (n=20).	71
Tableau n°17 : Tableau des corrélations entre les taux de normozoospermie analysés par microscopie et par le système HT-IVOS II avec plusieurs paramétrages (HBM187-AREA16 ; HBM140-AREA4) avec spz mobile (MOB) et immobilisés avant analyse (STAT) (n=20).	71

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

ALH : Amplitude of lateral head displacement

AREA :

ART: Assisted Reproductive Technology

BCF: Beat/cross frequency

BT : Bent Tail (Queue courbée)

CASA: Computer-aided sperm analysis

CT : Coild Tail (Queue enroulée)

DD : Distal Dropled (Gouttelette distale)

DMR : (Réflexes de la pièce médiane distale)

ELON : Elongation

FC: Frequence de capture

FI : VIn vitro fertilization

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

G: Gramme

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

HBM : HEAD BRIGHTNESS MIN

HT-IVOS II® : Hamilton Thorne IVOS II

Hz : Hertz

ICSI: Intracytoplasmic Sperm Injection

IMSI : Intracytoplasmic Morphologically Selected Sperm Injection

IUI: Intrauterine insemination

IVF: In vitro fertilization

L: Litre

LH : Luteinizing Hormone (hormone luthéinisante)

LIN: Linearity

MAD: Mean angular displacement

MED : la mobilité moyenne

Min : Minute

µm : Millimolar

ml : Millilitre

Nm: Nanometre

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PBRC/UB1: plate forme de la biotechnologie de la reproduction canine/université
blida

PD : Proximal Dropled (Gouttelette proximale)

PH : Potentiel Hydrogène

PROG : mobilité progressive des spermatozoïdes

RAP : La mobilité rapide

ROS: Reactive Oxygen Species

SCA®: Sperm Class Analyzer

SLOW : La mobilité lente

SPMI: seminal plasma motility inhibitor

SPZ : Spermatozoïde

STR: Straightness

TAC: total antioxidant capacity

VAP: Average-path velocity

VCL: Curvilinear velocity

VSL: Straight-line velocity

WOB : Wobble

I- INTRODUCTION

En Algérie, la Sûreté Nationale connaît parfaitement la valeur utilitaire du chien de travail, et l'emploie depuis longtemps comme un soutien cynotechnique dans l'accomplissement de ses missions d'investigation, de recherche et de lutte contre la criminalité. Devant la demande croissante en ressource canine, et la rareté de sa disponibilité sur le marché en quantité et surtout en qualité voulue, la Sûreté Nationale œuvre pour le lancement d'un programme d'élevage et de reproduction de chiens de service afin de couvrir ses besoins opérationnels sans recours à l'importation.

Les biotechnologies liées à la semence canine et particulièrement la maîtrise des méthodes d'analyse spermatique sont indispensables à la réussite de ce programme de reproduction et d'élevage de la sûreté Nationale. La morphologie des spermatozoïdes canins est un paramètre directement corrélé à leur pouvoir fertilisant, son analyse *in vitro* revêt alors un intérêt particulier pour l'obtention d'une fertilité *in vivo* (Suarez et Pacey, 2006).

Ce paramètre est classiquement évalué par observation microscopique après fixation et coloration sur lames porte-objet. Cette technique est assez précise sous condition d'expérience de l'opérateur, mais nécessite beaucoup de temps pour sa réalisation et implique la mobilisation du personnel de laboratoire et sa fatigue visuelle qui est source probable d'erreur. Cette technique classique peut aussi souffrir de subjectivité quand elle n'est pas réalisée par une personne hautement expérimentée (Auger et Eustache, 2000).

Le système d'analyse d'image ou analyseur assisté par ordinateur (CASA) est une bonne alternative à la technique classique. Il offre l'avantage de la rapidité, l'automatisation, la précision et la répétabilité par rapport aux inconvénients de la technique classique. En effet, le nombre de spz analysés par CASA peut se compter par milliers alors la technique classique ne compte que 100 à 200 cellules (OMS, 2021).

Par ailleurs, certains systèmes récents comme le HT-IVOS II, permettent l'analyse morphométrie automatique au même temps que la mobilité, offrant ainsi l'avantage d'éviter la fixation et la coloration des spz, déjà identifiées comme facteurs d'erreur dans la morphométrie sur lames colorées (Hidalgo et al. 2005 ; Vander horst *et al*, 2014).

Cependant, si la morphométrie sur lame colorée, a été largement étudiée et semble avoir été validée pour plusieurs système CASA par comparaison à la technique de référence recommandée par l’OMS (Buendia et al, 2002 ; Hidalgo et al, 2005, 2006 ; Maroto-Morales et al, 2010 ; Vander horst *et al.*, 2014 ; Estezo et al., 2015), il n’en est malheureusement pas de même pour la morphométrie automatique sans coloration.

Très récemment, O’meara et ses collaborateur (2021) ont étudié l’effet d’ajustement du paramétrage morphométrique du système HT-IVOS II sur les pourcentages d’anomalies des spz bovins congelés (O’méara et al., 2021). Dans cette étude, les changements de paramétrage morphométrique évaluées n’ont pas eu d’effet sur les résultats d’analyse. Notre hypothèse est que, les paramètres de détection cellulaire, notamment la brillance (contraste) et la taille de la tête du spz peuvent avoir un impact sur l’analyse de la morphologie.

A la limite de notre connaissance, aucune étude n’a encore porté sur l’effet du paramétrage de détection cellulaire du système HT-IVOS II dans la morphométrie automatique des spz canins.

Ainsi, le présent travail vise à évaluer l’effet du paramétrage de détection cellulaire des spz canins par le système HT-IVOS II sur l’analyse morphométrique automatique.

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

**CHAPITRE 01 : RAPPEL ANATOMO-PHYSIOLOGIQUE DE L'APPAREIL
GENITAL MALE.**

CHAPITRE 01 : RAPPEL ANATOMO-PHYSIOLOGIQUE DE L'APPAREIL GENITAL MALE.

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.

1.1 Les testicules et les voies spermatiques

1.1.1. Rappels anatomiques :

1.1.1.1 Conformation externe :

Les testicules sont des organes pairs, mesurant 3 à 4 centimètres de longueur sur 3 centimètres de largeur et pesant une vingtaine de grammes chez un chien de grande race. Leur taille est proportionnelle au poids du chien. Ils sont situés en région périnéale basse, dans le scrotum et ont une forme ovoïde, aplatie dorso-ventralement. On décrit donc deux faces : latérale et médiale, deux bords : épидидymaire et libre, et deux extrémités : caudée et capitée (en fonction du rapport avec la queue ou la tête de l'épididyme). Pour orienter les faces, on peut s'appuyer sur les rapports avec les voies adjacentes : le canal inguinal est proche du plan médial, où passe le conduit déférent, ce qui définit la face médiale. L'épididyme est en position plus latérale, ce qui permet de définir la face latérale (Barone, 1978) ;(Collin, 2003).

1.1.1.2 Conformation interne :

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. Le rete testis forme des canalicules efférents qui aboutissent au niveau de la tête de l'épididyme (**figure01**).

Le canal déférent prolonge l'épididyme et rejoint l'urètre au niveau du col de la vessie pour finir par s'aboucher 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).

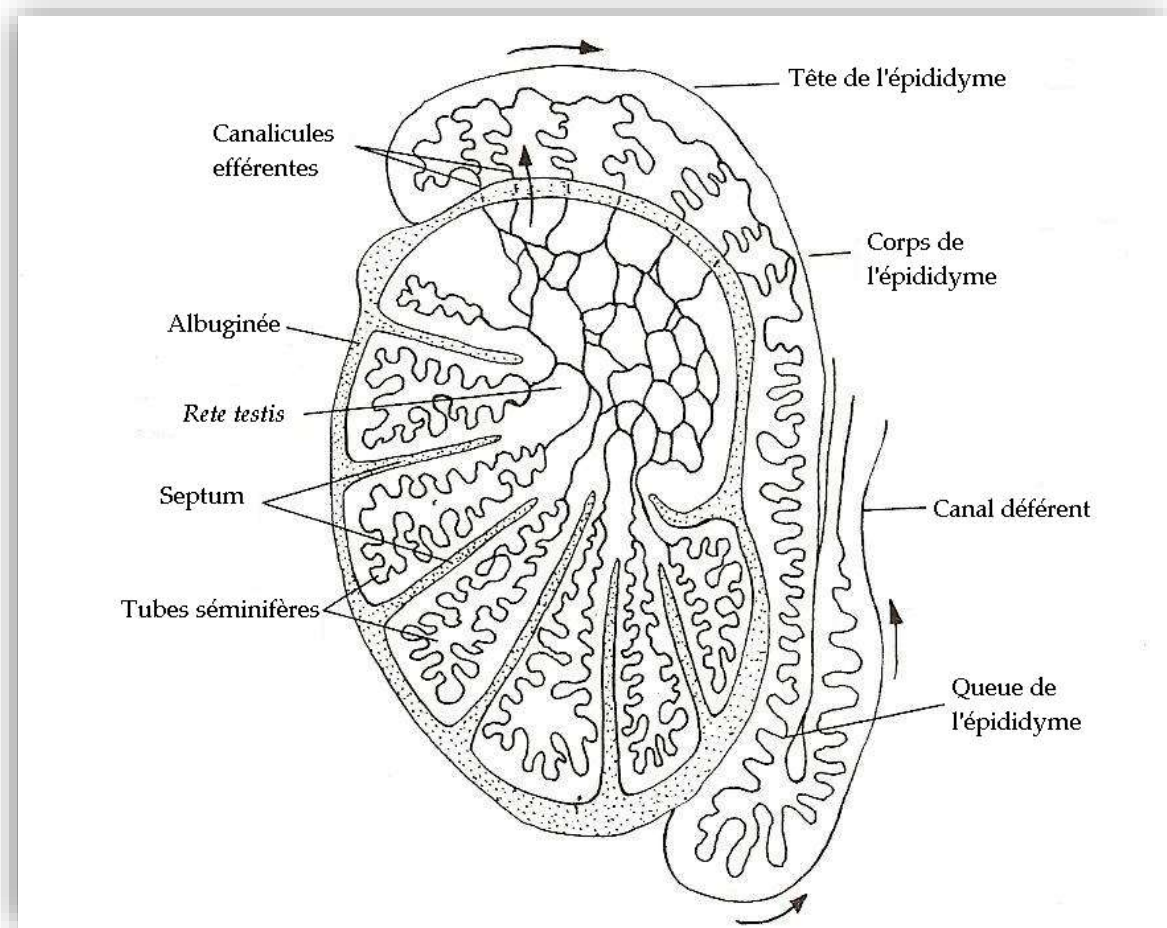


Figure N° 01: coupe longitudinale d'un testicule. (Reece W.O., 1997)

Les testicules sont très fortement vascularisés. 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).

1.1.2. Rôle des testicules :

1.1.2.1 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 02**). 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. 2001).

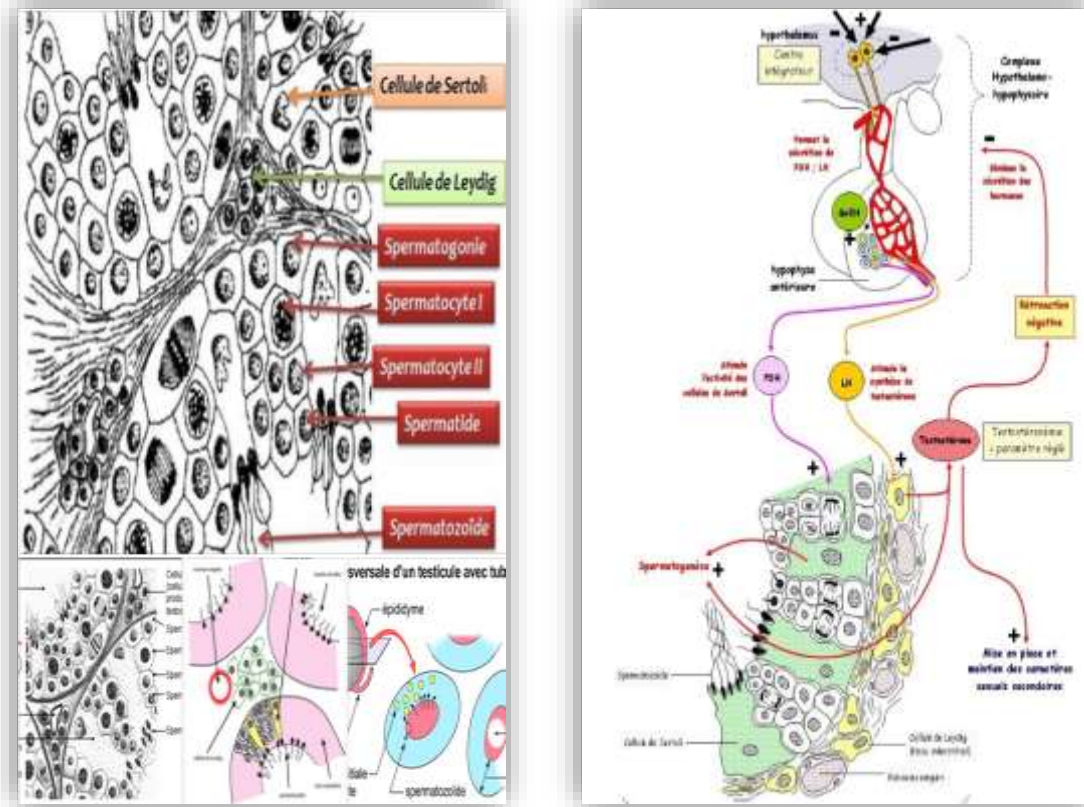


Figure N° 02 : Organisation interne du testicule et fonction endocrine (Fertilité-info, 2019).

1.2.2 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 ; 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 des spermatozoïdes par éjaculat (Fontbonne, 1992).

La spermatogénèse 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 spermatogénèse qui permet la différenciation des spermatides en spermatozoïdes. **(Figure 03).**

1.2. Pénis

1.2.1 Rappels anatomiques :

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 prépuce (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 (**figure04**). 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).

L'innervation du pénis est double :

✓ Une innervation parasympathique via le nerf honteux qui donne le nerf dorsal du pénis. Ce nerf est sensitif.

✓ Une innervation sympathique via le nerf hypogastrique. Ce nerf donne des fibres intervenant dans l'érection, dans la motricité des vaisseaux et dans la régulation des Sécrétions prostatiques. (Barone, 1978 ; Collin, 2003).

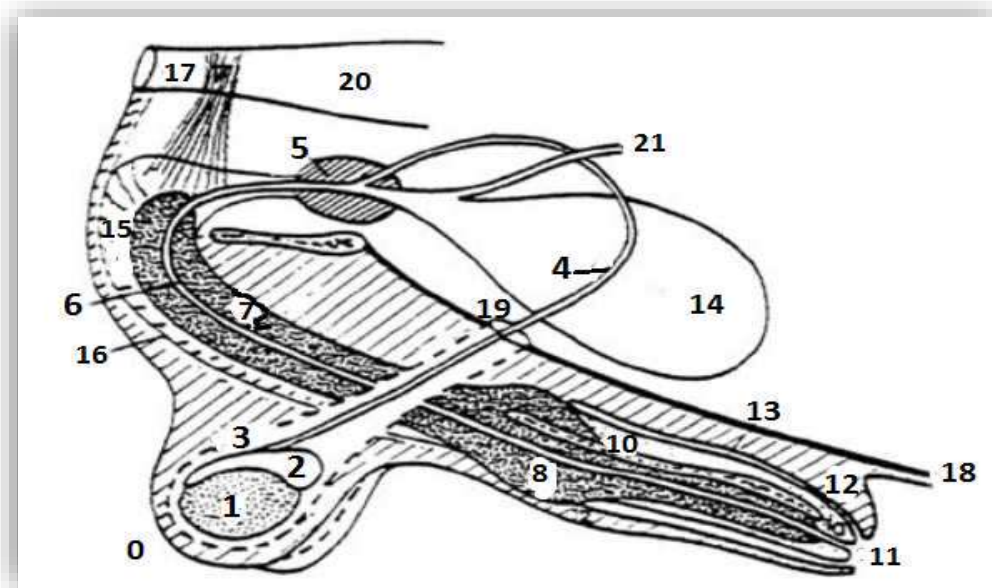


Figure N° 04 : L'appareil génital mâle (Mialot J.-P., 1984).

Légende :

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

1.2.2 Rappels physiologique (L'érection et l'éjaculation) :

➤ L'érection correspond à l'augmentation de la rigidité du pénis. La présence de l'os pénien empêchant une réelle augmentation de la longueur du pénis, c'est essentiellement au niveau de la largeur que le pénis subit une augmentation du volume notamment au niveau du bulbe érectile (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. 2001).

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. 2001). 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. 2001).

1.3. Les glandes accessoires :

Les sécrétions des glandes accessoires participent à la formation du plasma séminal être présentent 50 à 95% du volume total du plasma séminal. La contribution de chacune des glandes varie considérablement en fonction des espèces.

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 (Barone2001).

1.3.1 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).

1.3.2 Les glandes préputiales :

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

1.4. Physiologie sexuelle du chien :

La maturité sexuelle du jeune chien, c'est à dire la capacité à éjaculer un sperme fécondant, n'est effective qu'à partir de 10 à 15 mois en moyenne et jusqu'à 20 à 24 mois pour certaines races géantes.

La fertilité diminue chez le chien âgé (dès 7-8 ans voire plus tôt chez les molossoïdes) par diminution du nombre de spermatozoïdes produits et augmentation des formes anormales.

La spermatogénèse est le processus de différenciation cellulaire qui, d'une cellule souche de la lignée germinale (la spermatogonie) aboutit à un spermatozoïde, cellule apte à féconder. Elle dure de 62 à 64 jours chez le chien. La production testiculaire quotidienne est de 15 à 19 millions de spermatozoïdes par gramme de parenchyme c'est à dire de 200 millions à plus de 2 milliards de spermatozoïdes par éjaculat en fonction de la taille du chien (Fontbonne a, Dumon c ; 1992).

Lors de la spermatogénèse, le cytoplasme de la spermatide est éliminé et phagocyté par les cellules de Sertoli. Dans certains cas, un résidu de cytoplasme persiste au niveau du col du spermatozoïde sous forme d'une gouttelette. Ensuite, lors du transit épидидymaire, cette gouttelette résiduelle migre distalement vers la jonction pièce intermédiaire-pièce terminale du flagelle et peut alors être éliminée. Mais chez certains individus, la gouttelette résiduelle persiste sur une certaine proportion de spermatozoïdes. Chez le chien, c'est l'anomalie la plus observée avec une fréquence de 1 à 96 % (49, 50) et avec une grande variation d'un individu à l'autre.

La présence de gouttelettes résiduelles diminuerait la fertilité du sperme en agissant entre autres sur la mobilité et sur la formation de radicaux libres qui altèreraient les membranes du spermatozoïde (Guerin p., Fontbonne., Buff s, Menezoy ,1999).

CHAPITRE 02 : LA SEMENCE CANINE

CHAPITRE 02 : LA SEMENCE CANINE

2.1. Composition de la semence canine :

La semence canine est un liquide contenant les gamètes mâles (les spermatozoïdes) et les sécrétions provenant des glandes sexuelles accessoires (Le liquide séminal). Le liquide séminal est composé de fluides excrétés, de cellules et de débris cellulaires provenant des glandes sexuelles accessoires. Certains éléments du liquide séminal proviennent de la filtration du plasma sanguin tandis que d'autres sont produits par les glandes sexuelles (Prings, 1998). Le liquide séminal intervient à la fois dans le transport et la nutrition des spermatozoïdes. Ces deux éléments se mélangent lors de l'éjaculation (Prings, 1998). L'éjaculat de chien est un liquide blanchâtre. Le volume de l'éjaculat dépend de la race et de l'individu ; il varie de un à quatre-vingt millilitres (Johnston S.D., Root Kustritz M.V., Olson P.N.S. 2001). L'éjaculat de chien est composé de trois fractions (**Figure 05**) présentant des caractéristiques différentes tant au niveau de leur origine que de leur composition et de leur volume (tableau01) (Fontbonne a. Dumon c ; 1992).



Phase pré-spermatique

Phase spermatique

Phase post-spermatique

Figure N° 05 : les trois phases de l'éjaculat du chien (SAGOT Cécile ; 2019).

Tableau N° 01: Description des trois phases de l'éjaculat du chien (Fontbonne a, Dumonc ; 1992)

	Origine	aspect	Durée d'émission	volume	ph	Composition
La phase pré-spermatique	Prostatique	Blanc jaunâtre	30 à 50 secondes	0.2 à 2 ml	6.2 – 6.5	+ Moins de 3 millions de spermatozoïdes + Liquide Prostatique
La phase spermatique	Epididymaire	Blanchâtre aqueuse	2 à 3 minutes	0.5 à 3.5 mL	6.3 - 6.6	+ Très riche en spermatozoïdes + Sécrétion épидидymaire
La phase post-spermatique	Prostatique	Clair visqueux	5 à 7 minutes	4 à 30 mL et plus	6.5 - 7.0	+ Très rare spermatozoïdes + Liquide Prostatique

2.2. Récolte de la semence canine :

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.

2.2.1 Objectifs de la récolte de sperme :

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 (Kutzler, 2005).

2.2.2 Présentation des différentes techniques :

La méthode la plus utilisée actuellement pour le prélèvement de semence chez le chien est la récolte manuelle par Stimulation digital. 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. Cette méthode de récolte présente l'avantage de mimer au mieux l'accouplement ; cependant elle nécessite d'avoir des vagins de taille adaptée à chaque race et elle interdit le fractionnement de l'éjaculat (Fontbonne et Dumont, 1992).

2.2.3 La récolte par Stimulation digital :

2.2.3.1 Matériel nécessaire :

Le matériel nécessaire à la récolte de la semence par masturbation 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°06**). 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. En effet, la semence est sensible à de nombreux agents chimiques comme les détergents, le caoutchouc, le chlore, les sulfamides, les cônes doivent être soigneusement séchés afin d'ôter les résidus d'eau qui sont toxiques pour les spermatozoïdes. (Fontbonne et Dumont, 1992).

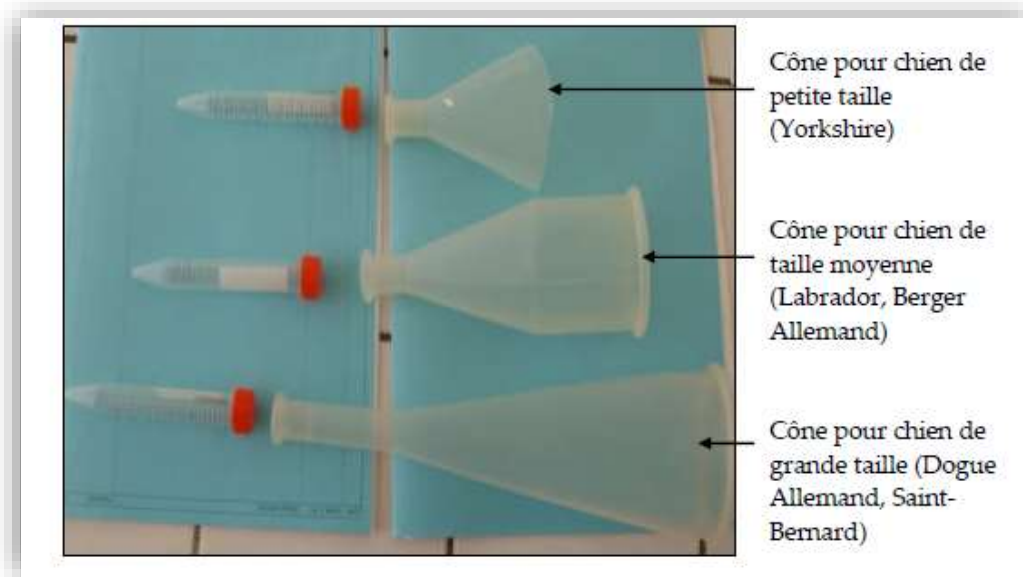


Figure N° 06: Matériel nécessaire à la récolte du sperme chez le chien. (Anne-Sophie Briffaut ; 2007)

2.2.3.2 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 (Kutzler, 2005 ; Feldman et Nelson, 1987). 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 07**). 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 (**figure08**). 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 09**).



Figure N° 07 : début de la récolte. (Anne-Sophie Briffaut ; 2007)



Figure N° 08:soulèvement d'un postérieur (Anne-Sophie Briffaut ; 2007)



Figure N° 09:orientation caudale du pénis (Anne-Sophie Briffaut ; 2007)

2.3. Le spermatozoïde canin :

2.3.1. Définition :

Le spermatozoïde est le gamète mâle. C'est une cellule haploïde hautement spécialisée, de forme oblongue. Il mesure **62 à 70 µm** chez le chien ; la **queue** mesure à elle seule **65 Mm** (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).

2.3.2. Structure :

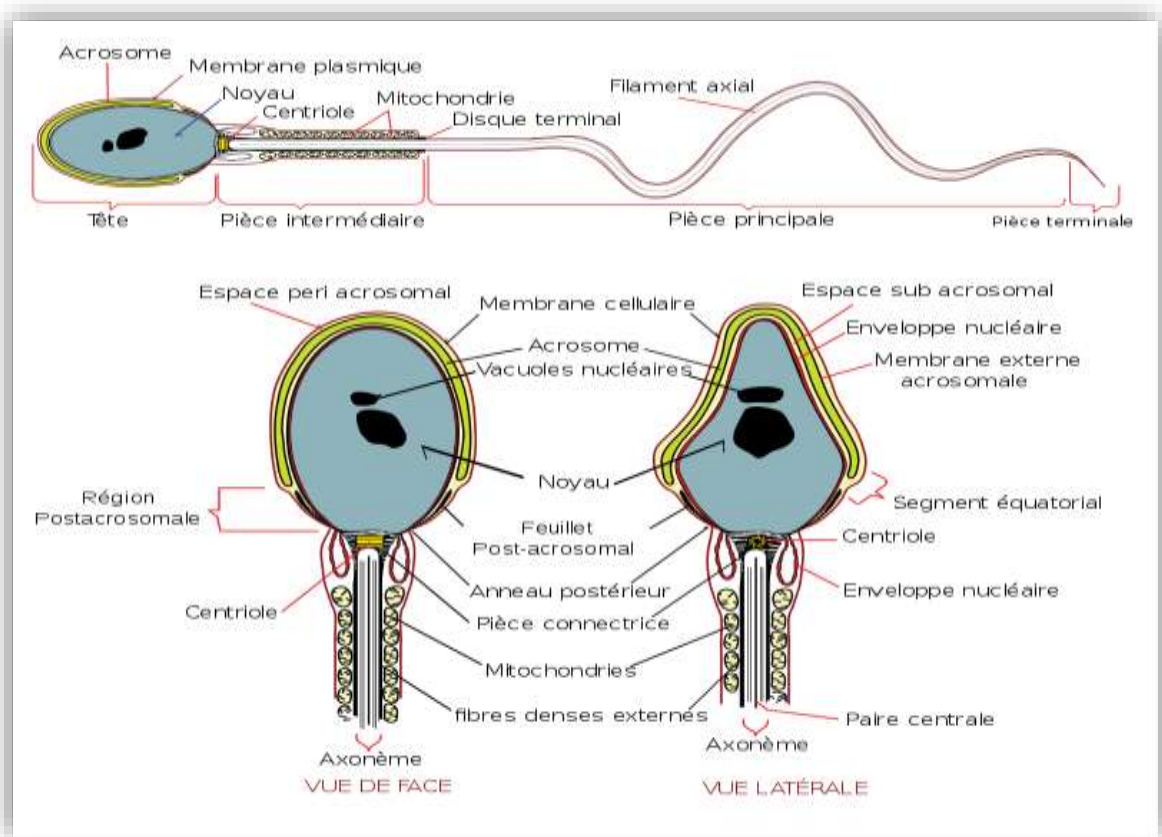


Figure N° 10 : Structure du spermatozoïde. (Dadoune et al. 1990)

2.3.2.1 La tête.

La tête du spermatozoïde contient le noyau et l'acrosome, ainsi qu'une quantité faible de cytoplasme et des éléments du cytosquelette. Elle est de forme ovoïde et aplatie dorso-ventralement chez le chien, et mesure 4 à 5 micromètres de longueur. L'acrosome suit les contours du noyau sur toute la partie crâniale (Dean and Lodhi, 2018) (**Figure10**).

3.3.2.2 Le flagelle :

Le mouvement des spermatozoïdes canins, comme de tous ceux des mammifères, dépend de leur flagelle. Celui-ci est composé de plusieurs parties essentielles : l'axonème, la gaine fibreuse et les fibres denses. L'énergie nécessaire à son mouvement est fournie par les mitochondries présentes dans la pièce intermédiaire. (Knobil and D. Neill, 1998). Chez le chien, Le flagelle mesure 55 micromètres et divisible en quatre sections : la pièce connective, la pièce intermédiaire, la pièce principale et la pièce terminale (**figure11**).

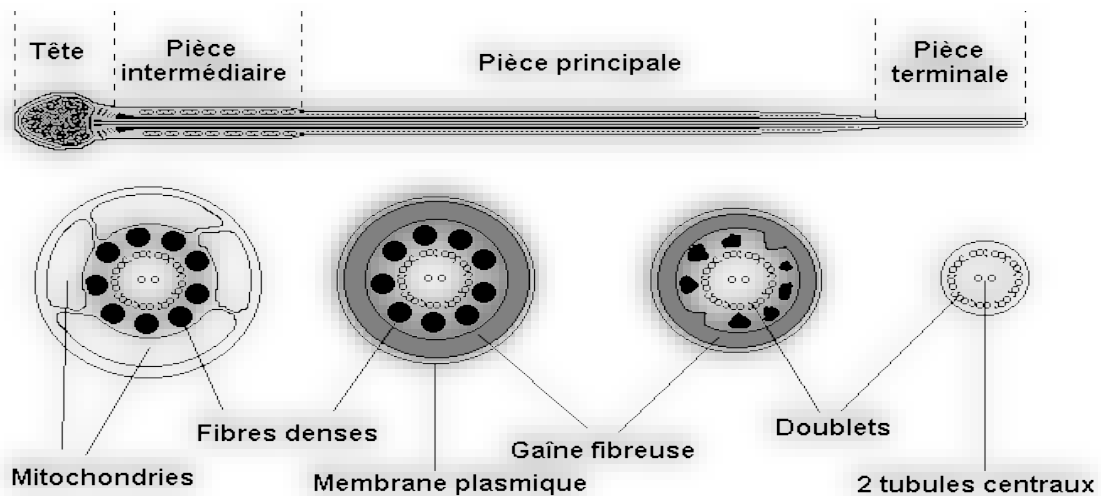


Figure N° 11 :L'ultra structure du spermatozoïde. (J-C. Czyba et A. Montella, 1993).

2.3.2.3 La membrane cytoplasmique :

La membrane cytoplasmique est constituée de lipides ; les lipides liés à des éthers en grande quantité, des acides gras insaturés en quantité proportionnellement plus importante que dans la membrane cytoplasmique des cellules somatiques, des glycolipides, des phospholipides et des stérols. Contrairement aux lipides des membranes cytoplasmiques des cellules somatiques, la plupart des lipides membranaires des spermatozoïdes ne peuvent pas diffuser librement au sein de la membrane (Millette, 1998).

La membrane cytoplasmique subit des changements de composition :

➤ au niveau lipidique : pendant le passage des spermatozoïdes dans l'épididyme et dans les voies génitales femelles (changement des proportions en cholestérol et en Phospholipides)

➤ au niveau protéique : les protéines se réorganisent pendant le passage dans l'épididyme, le passage dans le tractus génital de la femelle et au cours des dernières étapes de la capacitation et de la fécondation (Millette, 1998).

2.4. Les anomalies :

Les anomalies qui seront prises en comptes lors de l'examen microscopique seront : les gouttelettes, les anomalies du flagelle ou de la pièce intermédiaire, les spermatozoïdes présentant une anomalie de la tête ou encore les décapités. **(Figure 12).**

Ainsi, on remarque que les anomalies peuvent atteindre toutes les régions, et ce, de façon diverses et variées.

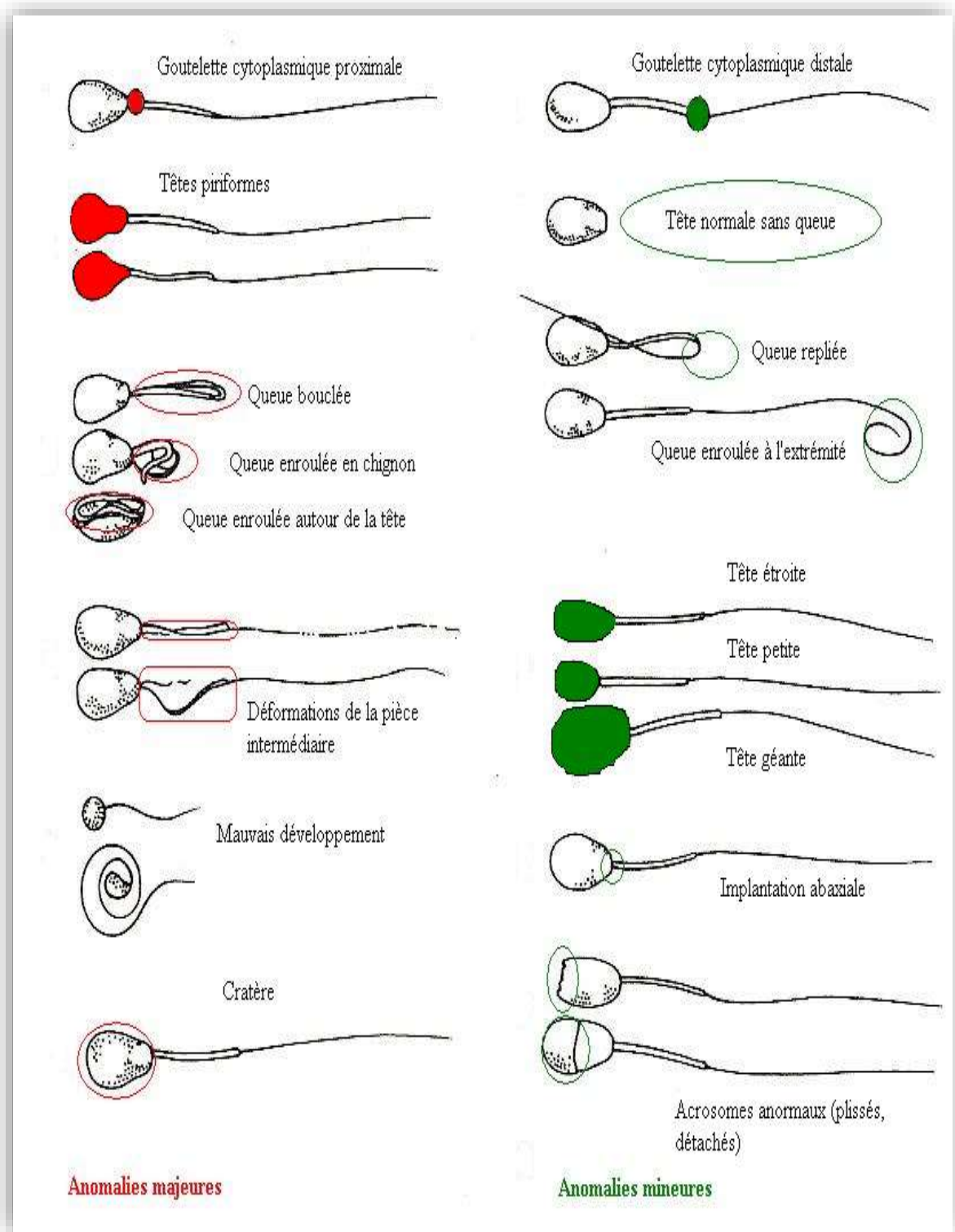


Figure N° 12: Principales anomalies morphologiques majeures et mineures.

(Dumont, 1997)

2.5. Examen du sperme canin

2.5.1. Le spermogramme

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

2.5.1.1. Volume

La lecture du volume de sperme récolté se fait directement sur les tubes de prélèvement gradués. Lors du prélèvement, il est possible de séparer les trois fractions de l'éjaculat. Ainsi, on diminue la dilution de la fraction spermatique et on facilite sa numération. De plus, il n'est pas utile de prélever la totalité de la fraction prostatique qui représente un grand volume pour un piètre intérêt. D'après, le volume total de l'éjaculat serait proportionnel à la taille de la prostate mais seule la phase spermatique présente réellement un intérêt et son volume varie entre 0,5 et 3,5 ml. (Fontbonne et Dumont, 1992).

2.5.1.2. Couleur et Aspect :

Le sperme canin est un liquide plus ou moins laiteux selon sa concentration en spermatozoïdes. Une coloration anormale peut révéler : une azoospermie (incolore), la présence de pus ou d'urine (jaunâtre-verdâtre) ou de sang (rosé). Une hémospemie peut être d'origine traumatique si, lors de la récolte, quelques vaisseaux sanguins superficiels du gland, très fragiles, ont été lésés. Elle peut également être due à une prostatite ou à une tumeur (Talon, 1999). La présence de sang ne semble pas vraiment nocive à la survie des spermatozoïdes du chien contrairement au pus et à l'urine (Linde-Forsberg, 1995).

2.5.1.3. Odeur :

Le sperme canin est normalement inodore. Une odeur particulière peut signer une contamination par de l'urine ou du pus.

2.5.1.4. Mobilité

La mobilité des spermatozoïdes doit être évaluée dans les plus brefs délais après la récolte. Cet examen est réalisé sur une platine chauffante (37°C) pour éviter un ralentissement des spermatozoïdes causé par leur refroidissement. Il s'effectue en deux temps :

2.5.1.4.1 Observation de la mobilité de masse :

Une goutte de sperme est observée entre lame et lamelle au grossissement 10 afin d'apprécier les mouvements de réunion et de dispersion des spermatozoïdes. Lorsque la mobilité est maximale, on peut observer un mouvement de vague. L'intensité des vagues provoquées par le mouvement des spermatozoïdes est évaluée. Une note de 0 à 5 est attribuée à l'échantillon observé, selon une échelle de notation telle que celle proposée dans le (**Tableau02**).

Ce test est peu précis mais permet également d'avoir une estimation de la concentration en spermatozoïdes.

Tableau N° 02: Echelle d'appréciation de la motilité massale du sperme du chien

(Fontbonne, 1992).

Note	Interprétation
0	Aucun mouvement
1	Les spermatozoïdes bougent sans former de mouvement d'ensemble.
2	Les spermatozoïdes ébauchent des mouvements d'ensemble circulaires
3	Les mouvements d'ensemble représentent des cercles centrés sur eux-mêmes.
4	Les spermatozoïdes ont un mouvement d'ensemble. Ils forment des vagues rondes qui se déplacent.
5	Les mouvements d'ensemble se densifient. Les spermatozoïdes bougent en tousSens

2.5.1.4.2 Observation de la mobilité individuelle :

Une goutte de sperme est observée en contraste de phase au grossissement 10. Le sperme canin est suffisamment dilué naturellement pour qu'il n'y ait pas besoin, en général, de le diluer pour pouvoir individualiser les spermatozoïdes. Le but de cet examen est de déterminer le pourcentage de spermatozoïdes mobiles ainsi que la proportion de spermatozoïdes fléchants c'est à dire traversant rapidement le champ en ligne droite. Un sperme de bonne qualité comporte plus de 70 % de spermatozoïdes fléchants. Il est également possible de déterminer le pourcentage de spermatozoïdes mobiles au grossissement 40. Les résultats de cet examen sont subjectifs mais l'erreur est faible si la lecture est toujours effectuée par un même opérateur expérimenté.

2.5.1.5. PH :

Cette mesure n'est pas réalisée en routine mais est intéressante en cas d'asthénospermie (diminution de la mobilité des spermatozoïdes). En effet, des pathologies telles qu'une inflammation des glandes annexes (prostatite) ou une cystite peuvent modifier le pH et incommoder les spermatozoïdes.

Le pH normal du sperme est légèrement acide (5,8-6,9) et a tendance à s'acidifier au cours du temps en raison de l'activité métabolique des spermatozoïdes. Cette acidification est néfaste pour la survie des spermatozoïdes d'où l'intérêt de tamponner rapidement le sperme récolté.

2.5.1.6. Numération :

La numération s'effectue après avoir dilué une fraction de sperme avec un liquide hypertonique (chlorure de sodium à 3 %) qui immobilise les spermatozoïdes. La dilution réalisée à l'aide d'un tube capillaire gradué (mélangeur de Potain), dépend de l'aspect macroscopique initial de la semence (claire ou laiteuse) et de l'observation préalable de la mobilité qui donne une idée de la concentration en spermatozoïdes :

- Ejaculat clair : dilution au 1/10° ou au 1/20° avec un mélangeur à bille blanche.

- Ejaculat laiteux (généralement le cas lorsque les phases ont été fractionnées) : dilution au 1/100° ou au 1/200° avec un mélangeur à bille rouge.

Après agitation du mélangeur, une goutte est déposée entre lame et lamelle sur une cellule hématimétrique (dite de Thoma ou de Mallassez ou de Neubauer) après avoir éliminé les premières gouttes, pauvres en spermatozoïdes. Les spermatozoïdes sont dénombrés au grossissement 40 en contraste de phase 4l'intérieur de cinq carrés de la cellule hématimétrique. On fait ensuite la moyenne de ces cinq carrés. A partir de cette valeur, la concentration en spermatozoïdes de la phase spermatique est calculée en fonction de la dilution réalisée.

Enfin, on obtient le nombre de spermatozoïdes présents dans l'éjaculat en multipliant la concentration de la phase spermatique par le volume de sperme total.

2.5.1.7. Vitalité :

La vitalité des spermatozoïdes est également un facteur important pour l'estimation de la fertilité d'un éjaculat. La mesure de la vitalité est obtenue par coloration à l'éosine-bleu d'aniline qui fait apparaître les spermatozoïdes morts en rose. Les spermatozoïdes vivants restent incolores. En pratique, une goutte de sperme est mélangée pendant quelques secondes à une goutte de colorant à l'aide d'une baguette de verre. Un étalement est réalisé à partir de ce mélange et séché à l'air libre. La lecture de cent spermatozoïdes au grossissement 40 et en lumière directe donne le pourcentage de vivants et de morts, bon indice de la qualité d'un sperme. La lecture peut être effectuée ultérieurement une fois le frottis réalisé. Il ne faut néanmoins pas attendre plus de 48 heures car ensuite, le frottis s'altère.

2.5.2. Le spermocytogramme :

Il permet d'apprécier la morphologie des spermatozoïdes. Les colorants utilisables pour observer la morphologie des spermatozoïdes sont l'éosine-nigrosine, l'éosine-bleu d'aniline, le Spermac®. Les spermatozoïdes sont regardés au grossissement $\times 400$ (Fontbonne, 1995).

Les anomalies concernent la tête, la queue ou la pièce intermédiaire. Elles peuvent être classées en anomalies primaires et secondaires selon leur origine.

Les anomalies primaires comme les gouttelettes cytoplasmiques proximales ou les anomalies de la pièce intermédiaire ou de la pièce connective apparaissent pendant la spermatogénèse alors que les secondaires telles que les queues enroulées ou tordues apparaissent lors du transit des spermatozoïdes ou es dans l'espèce Canine.

Les anomalies peuvent également être classées en anomalies majeures et en anomalies mineures selon qu'elles sont ou non corrélées avec une diminution de la fertilité (**Figure 12**). (Feldman et Nelson, 1987 ; Johnston et al. 2001b).

La présence de gouttelettes proximales est une anomalie majeure entraînant une diminution de la fertilité. PENA et son équipe ont réalisé une étude dans laquelle ils comparent l'attachement des spermatozoïdes de deux chiens à la zone pellucide d'oocytes issu d'ovaires congelés ; l'un des chiens est un mâle ayant laissé plusieurs chiennes vides et dont 96% des spermatozoïdes présentent une gouttelette proximale, l'autre chien a une fertilité normale et seulement 13% de ses spermatozoïdes ont une morphologie anormale. Les résultats de cette étude montrent que les spermatozoïdes du premier chien sont moins nombreux à s'attacher à la zone pellucide que les spermatozoïdes du second chien. Cette anomalie semble donc à l'origine d'une diminution de l'aptitude des spermatozoïdes à s'attacher à la zone pellucide (Pena et al. 2007). Lorsque plusieurs anomalies sont rencontrées sur le même spermatozoïde, c'est l'anomalie la plus importante qui est comptabilisée. Si les anomalies sont d'importance équivalente, c'est l'anomalie la plus fréquente qui est prise en compte. (Oettle, 1993).

La lecture de cent spermatozoïdes, au grossissement 40 et en contraste de phase, permet d'obtenir le pourcentage de spermatozoïdes anormaux dans la semence examinée. Au-delà de 30 % d'anormaux, la semence est dite de mauvaise qualité. Cependant, un fort pourcentage de spermatozoïdes anormaux peut être partiellement compensé en semence fraîche par une forte concentration. Selon (Fontbonne et Dumon, 1992) un sperme canin serait fécondant avec au minimum 100 à 150 millions de spermatozoïdes normaux et mobiles. Le spermocytogramme ne devrait pas excéder 20 à 30 % de spermatozoïdes anormaux et la mobilité normale doit être supérieure à 70 %. Ces facteurs sont également importants à prendre en compte lorsque la semence est destinée à être congelée et à garder un pouvoir fécondant après décongélation.

Tableau N° 03: Classification des anomalies du spermatozoïde de chien (Freshman, 2002).

ANOMALIES DU SPERMATOZOÏDE		
	Anomalies primaires	Anomalies secondaires
Anomalies de tête	<p>Tête piriforme</p> <p>Tête amincie</p> <p>Tête allongée</p> <p>Tête petite (microcéphalie)</p> <p>Tête géante (macrocéphale)</p> <p>Tête ronde</p> <p>Tête déformée</p> <p>Tête double</p>	<p>Tête détachée</p>
Anomalies de la pièce Intermédiaire	<p>Pièce intermédiaire double</p> <p>Pièce intermédiaire enflée</p> <p>Gouttelettes cytoplasmiques proximales</p>	<p>Gouttelettes cytoplasmiques Distales</p>
Anomalies de queue	<p>Queue double</p> <p>Queue cassée</p> <p>Queue enroulée en chignon ou enroulées autour de la tête</p>	<p>Queue tordue</p> <p>Queue enroulée distalement</p> <p>Queue repliée</p>
Autres anomalies		<p>Acrosomes anormaux</p>

2.5.3 Technique CASA (Analyse Spermatique Assisté par Ordinateur) :

Est une méthode microphotographique. Il consiste en un dispositif incluant un matériel d'enregistrement microphotographique et en un support informatique pour la reconstruction et l'analyse des trajets. Cette technique permet de générer un nombre considérable de paramètres obtenus grâce à l'analyse individuelle de chaque spermatozoïde. (MaoJ et al 2005).

Cette technique permet donc de réaliser des analyses objectives et précises sur la proportion de spermatozoïdes mobiles et leur mouvement (Blanch E, et al 2008).

Dans l'espèce canine, Günzel– Appel et al (1993) sont les premières à évaluer l'intérêt de cet outil dans l'analyse de la semence canine. Selon Iguer-Ouada(2001), quatre études seulement ont utilisé cet outil entre 1993 et 2001.

En 2001, Iguerouada et Versteegen ont validé pour la première fois le système d'analyse informatique SCA : Sperm Class Analyzer – version 3.2.0 fabriqué par Microptic SL, Barcelona, Spain pour l'analyse de la semence canine. Ce système s'est avéré d'une bonne précision dans l'analyse du sperme canin à condition d'être utilisé avec les bonnes spécifications techniques recommandées dans cette étude (Johnston S, Root Kustritz M V, Olson P 2001).

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

L'appareillage de cette technique est composé de :

- Un système optique interne avec un microscope à lumière intermittente (permettant de s'affranchir de l'image floue imposée par les mouvements permanents des spermatozoïdes).
- Une platine chauffante à 37°C pour maîtriser la température et éviter un choc thermique aux spermatozoïdes.
- Une caméra et un convertisseur d'image.

- Un ordinateur qui permet d'afficher les images à l'écran et qui contient surtout le logiciel IMSI Strict TM (Intracytoplasmic Morphologically Selected Sperm Injection) qui va analyser les images.

Pour effectuer l'analyse, on place un échantillon de trois microlitres de sperme à l'aide d'une micropipette dans une cellule de Leja® qui contient quatre chambres comme celle présentée dans la photographie.

Au sein de l'appareil, la cellule de Leja® est maintenue à 37°C ; il est donc important de la placer sur une platine chauffante avant son utilisation pour éviter un choc thermique aux spermatozoïdes.

Le logiciel informatique va analyser une succession d'images (le nombre d'images étant défini par le manipulateur) et reconstituer la trajectoire propre de chaque spermatozoïde en reconnaissant leur tête et en suivant leurs mouvements ainsi que la morphologie de l'ensemble de la cellule.

L'analyse de ces images va permettre de donner une grande quantité d'informations objectives sur la semence et adaptée à chaque appareil (Boryshpolets et *al*, 2013) :

- ✓ La mobilité individuelle des spermatozoïdes :

La mobilité progressive des spermatozoïdes (PROG).

La mobilité rapide (RAP), la mobilité moyenne (MED).

La mobilité lente (SLOW).

- ✓ Les vitesses de déplacement des spermatozoïdes :

La vitesse progressive moyenne (VAP, Velocity Average Pathway) exprimée en micromètre par seconde ($\mu\text{m/s}$).

La vitesse linéaire (VSL, Velocity Straight Line) exprimée en $\mu\text{m/s}$ (il s'agit de la vitesse de déplacement du spermatozoïde sur une droite fictive reliant la position de sa tête sur la première image analysée et la position de sa tête à la fin de l'analyse).

La vitesse curvilinéaire (VCL, Velocity Curvilinear Line) exprimée en $\mu\text{m/s}$ (c'est la vitesse de déplacement du spermatozoïde en une seconde sans tenir compte de sa trajectoire).

- ✓ La vivacité des spermatozoïdes :

L'amplitude des mouvements latéraux de la tête (ALH, Amplitude Lateral Head) exprimée en μm .

La fréquence des battements de la tête (BCF, Beat Cross Frequency) exprimée en Hertz (Hz).

L'élongation des spermatozoïdes (ELON) exprimée en pourcentage (qui est le rapport entre la longueur minimale et maximale de la tête à la queue du spermatozoïde).

- ✓ Le comportement des spermatozoïdes :

La rectitude (STR, Straightness) exprimée en pourcentage (c'est le rapport (VSL/VAP) x100).

La linéarité (LIN, Linearity) exprimée en pourcentage (c'est le rapport (VSL/VCL) x100).

- ✓ La concentration de la semence
- ✓ Le nombre de cellules comptées
- ✓ L'image visible sur l'écran permet d'observer des anomalies potentielles de morphologie.

**CHAPITRE 03 : ANALYSE DE LA
MORPHOLOGIE DU SPERMATOZOÏDE
CANIN**

CHAPITRE 03 : ANALYSE DE LA MORPHOLOGIE DU SPERMATOZOÏDE CANIN

3.1. Introduction

La morphologie du spermatozoïde constitue un paramètre important dans l'exploration de la qualité du sperme infertile. Cependant son évaluation est dépendante de la méthodologie utilisée et de l'entraînement de l'observateur. Le spermatozoïde est l'aboutissement d'un long processus de différenciation survenant au cours de la spermatogenèse et de la maturation durant le transit épидидymaire. Chacune de ces étapes peut être altérée avec pour conséquence une production excessive de spermatozoïdes anormaux appelée **tératozoospermie**. Le seuil pathologique pour définir la tératozoospermie dépend des classifications utilisées. On parle de tératozoospermie isolée, lorsque les autres paramètres spermatiques sont normaux. L'analyse de la morphologie spermatique est soumise à un nombre important de difficultés comme le manque d'objectivité avec des variations d'interprétation entre les différents laboratoires mais aussi dans un même laboratoire imputable à la subjectivité de la lecture humaine (Fontbonne et Dumon ,1992). Les variations observées sont également liées au manque de standardisation des méthodes d'examen (Fraser et Androl, 1982). Et au choix de la classification (Fraser et al, 1990). Il existe de nombreuses classifications dans le monde ce qui rend la standardisation de cet examen difficile. En 2010, l'OMS a publié un nouvel ouvrage qui a essayé de standardiser les pratiques et ainsi rendre à cet examen son intérêt diagnostique qui a baissé au fil des modifications des classifications.

3.2. Analyse conventionnelle :

3.2. 1. Spermocytogramme :

Les premières études concrètes de la morphologie des spermatozoïdes ont débuté dans les années 1960-1970 avec les travaux de MacLeod (1970) et de plusieurs autres équipes comme Eliasson et Van Duijn (1972). Les études morphométriques menées par Van Duijn et son équipe ainsi que par les travaux d'Eliasson ont fourni dès 1972 des dimensions précises pour définir la tête normale du spermatozoïde. Le seuil normal de FT était fixé à 60% à cette époque.

En 1975, en France, le docteur Georges David propose une classification qui sera largement et exclusivement utilisée en France. La classification de David définit le spermatozoïde normal à partir de spermatozoïdes récupérés dans le mucus cervical en post coïtal. Un spermatozoïde porteur de plusieurs anomalies est identifié par l'ensemble de ses anomalies. Au début des années 1990 puis en 2000 (Auger et Eustache), cette classification a subi des modifications avec une redéfinition des catégories d'anomalies et l'apparition de l'IAM.

L'IAM est considéré comme un indicateur prédictif significatif du pouvoir fécondant des spermatozoïdes aussi bien in vivo qu'in vitro. La valeur du pourcentage de spermatozoïdes typiques a été baissée à 50 %. Au même moment, (David Mortimer et Roelof Menkveld ,2001) travaillent avec Thinus Kruger à l'hôpital de Tygerberg en Afrique du Sud. Ils s'intéressent à la morphologie des spermatozoïdes et à son intérêt dans l'évaluation de la fertilité masculine. Ils créent une classification qui deviendra une référence mondiale.

La classification de Kruger est décrite comme étant plus sévère et plus discriminante que les autres classifications (Fontbonne et Dumon ,1992) avec une meilleure valeur prédictive positive sur les résultats de FIV que la classification de David (Geussova et al, 1997), (Gillan et al, 1997). Il est recommandé d'analyser au moins 100 spermatozoïdes pour fournir une évaluation acceptable du pourcentage de spermatozoïdes typiques, la référence étant 200 spermatozoïdes (Fraser et al, 1990).

Quelle est la morphologie des spermatozoïdes ?

La morphologie du sperme fait référence à la forme du sperme, qui comprend la taille de la tête et la teneur en ADN de la tête (révélé par une coloration nucléaire), l'apparence de la pièce médiane et la structure de la queue. La forme de la tête est importante car elle peut affecter la capacité du sperme à pénétrer la surface externe de l'ovule pour le féconder.

La morphologie des spermatozoïdes est évaluée lors d'une analyse de routine du sperme qui examine les spermatozoïdes au microscope. L'analyse du sperme examinera également la motilité (capacité de mouvement) et la concentration des spermatozoïdes présents.

Chaque sujet, fertile ou infertile, a des pourcentages variables de spermatozoïdes de forme anormale. De nombreux facteurs peuvent entraîner des spermatozoïdes de forme anormale, notamment une augmentation de la température testiculaire, une exposition à des produits chimiques toxiques, une infection et des traits génétiques. Le terme médical désignant lorsqu'un homme a un grand nombre de spermatozoïdes de forme anormale est la tératozoospermie ou la tératospermie.

Le Centre de fertilité et de FIV de Loma Linda utilise les critères stricts de Kruger pour évaluer la morphologie des spermatozoïdes, qui sont utilisés par la plupart des médecins. Vous trouverez ci-dessous les scores des critères stricts de Kruger et leurs explications :

- Plus de 14 % des spermatozoïdes ont une morphologie normale - forte probabilité de fertilité
- 4-14 pour cent - la fertilité a légèrement diminué
- 0-3 pour cent – fertilité extrêmement altérée.

L'Organisation mondiale de la santé a également publié ses propres critères d'analyse du sperme. Depuis 2010, ils considèrent la présence de 4% et plus de spermatozoïdes ayant une morphologie normale comme la composition idéale de l'échantillon pour la fertilité.

Un spermatozoïde normal aura une tête de forme ovale, une pièce médiane intacte et une seule queue non enroulée. Les spermatozoïdes de morphologie normale sont capables de bien nager et en ligne droite. Le sperme normal contiendra également des informations génétiques saines plutôt que d'avoir trop ou trop peu de chromosomes, ce qui est courant dans les spermatozoïdes de forme anormale.

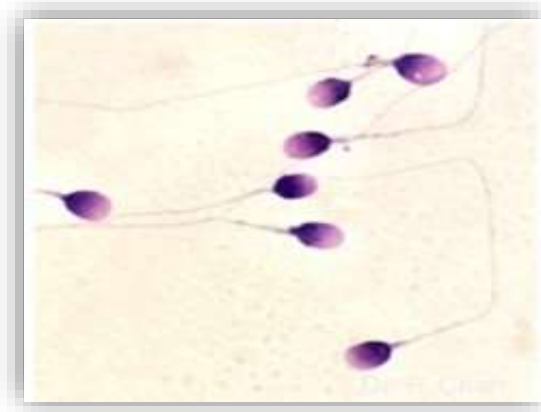


Figure N° 13: sperme de forme normal (personnel)

3.3. Analyse informatisé système CASA :

CASA est un système automatisé composé d'un hardware et d'un software qui sert à visualiser et numériser une séquence d'images de sperme. Il permet l'obtention de résultats clairs, précis, qui nous informent sur différentes qualités de paramètres spermatiques, notamment la concentration, la motilité, la morphologie, et la morphométrie (Talarczyk-Desol et al. 2017).

Après numérisation des spermatozoïdes et mise en place des coordonnées (x, y) sur le champ d'observation, la même procédure est répétée lors des captures successives suivantes. Ensuite, un algorithme est utilisé afin d'analyser toutes les données et de reconstruire les trajectoires individuelles des spermatozoïdes.

La première étape de ce processus consiste à identifier toutes les têtes de spermatozoïdes et à les enregistrer. Certains systèmes CASA reconnaissent la tête du spermatozoïde comme une série de pixels, calculant le centre d'une structure appelé « centriole »; tandis que d'autres utilisent la numérisation des pixels circonférentiels d'un objet pour calculer le centriole. Ainsi, le point le plus brillant sur la tête du spermatozoïde ou le centre de la tête est utilisé et est considéré comme point de référence (Lu et al, 2014).

Le développement de l'analyse spermatique assistée par ordinateur (CASA) au cours des années 1980 a suscité une grande excitation, bien que les systèmes ne fussent que des boîtes noires capables de suivre le mouvement du sperme, sans pour autant pouvoir générer des données vérifiables avec un nombre de captures limité à 30 captures par seconde (Mortimer, 1990 : Amann et Waberski, 2014 : Mortimer et *al.*, 2015). Dans les années 1990 et au début des années 2000, les progrès en informatique ont entraîné plusieurs améliorations aux systèmes CASA. Pendant ce temps, CASA a gagné de la valeur, en particulier dans le domaine de la recherche.

Dans les premiers stades de développement du système CASA, divers problèmes sont apparus, par exemple, initialement, CASA ne pouvait pas différencier les spermatozoïdes des particules de même taille. Pour résoudre ce problème, diverses approches ont été essayées à travers des modifications et des améliorations du logiciel, par exemple, la présence du flagelle comme condition préalable (Neuwinger et al. 1990 ; Wijchman et al. 1995) ou l'utilisation de colorants pour la coloration de l'ADN des spermatozoïdes (Zinaman et al. 1996).

De nouveaux modèles CASA, plus développés avec une fréquence de capture de 50 à 60Hz ont été commercialisés vers 1990. On cite, Hamilton-Thorn et Motion Analysis (Etats-Unis), le Sperm Class Analyze de Microptics SL (Espagne), Hobson Tracker (UK), le Sperm Motility Quantifier (Afrique du Sud), Sperm Vision (Allemagne) et Proiser/ISAS (Espagne) et tant d'autre.

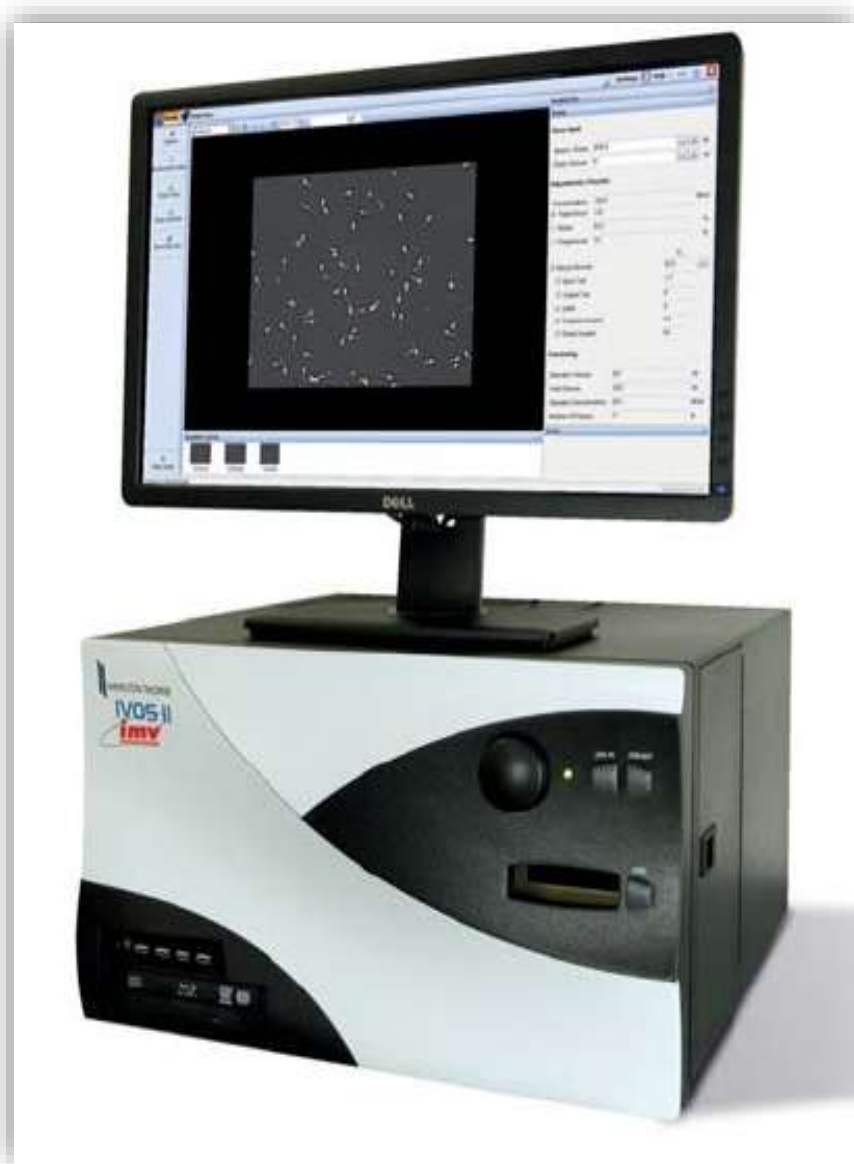


Figure N° 14: Equipement pour L'analyse Spermatique assistée par ordinateur, Hamillton Thorn IVOS II (Guide IMV 2020)

3.3.1 Paramètres étudiés avec CASA :

Le système CASA permet l'évaluation de nombreux paramètres, dont on cite :

3.3.1.1 La Concentration :

La concentration est certainement l'un des paramètres les plus importants lors de l'évaluation du sperme, car l'infertilité a été associée à un faible nombre de spermatozoïdes chez de nombreuses espèces (Bielsa MA et al, 1994. Boatman DE et al, 1984). L'évaluation précise de la concentration de sperme à l'aide des systèmes CASA reste un problème pour toutes les espèces dans lesquelles ce paramètre a été étudié. En effet, la surestimation semble être une observation courante (Comhaire FH et al, 1992, Iguer-Ouada M et al, 2001). Cela a été attribué par différents auteurs à des collisions entre les spermatozoïdes ; ce qui mène à des évaluations multiples du même spermatozoïde faussant le résultat (Coetzee K et al, 2001[7]) (Douglas-Hamilton et al. 2005).

3.3.1.2 Motilité :

L'évaluation de la motilité des spermatozoïdes est une partie fondamentale de l'analyse du sperme car elle fournit des informations essentielles sur la compétence fonctionnelle et le potentiel fertilisant des spermatozoïdes (Gunalp et al. 2001 ; Simon et Lewis, 2011).

Les paramètres de motilité dérivés de CASA comprennent la motilité totale, la motilité progressive, la motilité non progressive, statique, progressive rapide [type a], lente progressive [type b], non progressive [type c] et immobile [type d]). De plus, les systèmes CASA permettent d'obtenir des données vérifiables, car les images vidéo précédemment analysées peuvent être réexaminées pour des évaluations périodiques de contrôle de qualité interne et externe.

Les systèmes CASA-Mot actuels se focalisent presque exclusivement sur l'analyse et le suivi de la tête du spermatozoïde, certains systèmes plus récents commençant à rechercher la présence du flagelle afin d'aider à exclure les débris et autres objets étrangers des analyses. Cependant, mécaniquement, c'est le flagelle qui propulse le spermatozoïde et, à ce titre, le comportement du flagelle est la caractéristique fondamentale gouvernant la motilité des spermatozoïdes.

Le flagelle est souvent traité comme une simple « roue », contribuant uniquement au mouvement de la cellule, plusieurs études ont démontré que cela est faux. En effet, la tête du spermatozoïde n'est qu'un poids qui cause une trainée avant d'atteindre le lieu de fécondation, le flagelle agit comme un moteur à travers l'axonème (Machin 1958), comme un appareil de détection (Brokaw 1991), réagissant à la présence de viscosité (Smith et al. 2009b), permettant un comportement rhéotaxique (Miki et Clapham 2013) et guidant la migration grâce à la détection des bords le long de passage du tractus génital femelle (Denissenko et al., 2012). En prenant en considération cela, nous pensons que le moyen le plus efficace pour développer CASA-Mot, et ainsi agrandir le cercle d'utilisation des analyses assistées par ordinateur dans le diagnostic clinique est l'introduction du suivi flagellaire, comme l'ont fait les pionniers Hiramoto et Baba (1978).

3.3.1.3 Cinématique :

En plus d'être de puissants outils analytiques pour évaluer la motilité des spermatozoïdes, les systèmes CASA fournissent des détails supplémentaires sur le mouvement des spermatozoïdes en déterminant leurs caractéristiques cinématiques. Chaque sperme individuel dans le champ de vision est identifié, une série d'images numériques du mouvement de la tête des spermatozoïdes est ensuite capturée. Cela permet de reconstituer leurs trajectoires individuelles (Mortimer et al. 2015).

Le suivi de la progression de la tête du spermatozoïde nous a toujours renseigné sur les différents paramètres cinématiques, et cela bien avant l'introduction de l'ordinateur dans l'analyse spermatique (Katz and Overstreet 1981 ; Holt et al. 1985). Les différents mouvements individuels du spermatozoïde évalués par CASA sont :

Curviline Velocity (VCL) : s'exprime en micromètre par second ($\mu\text{m/s}$), la VCL mesure la vitesse moyenne en temps du centroïde de la tête du spermatozoïde le long de son chemin curviligne réel. Il est calculé en trouvant la distance totale entre le premier et le dernier point de tête divisée par le temps écoulé, La VCL peut être un indicateur du dynamisme du spermatozoïde.

Linearity (LIN) : ou linéarité du chemin curviligne, définie comme le rapport VSL/VCL.

Wobble (WOB) : défini comme le rapport VAP/VCL, qui est une mesure de l'oscillation du chemin réel par rapport au chemin moyen.

Straight Line Velocity (VSL) : exprimé en $\mu\text{m/s}$, elle est définie comme la vitesse moyenne dans le temps du centroïde de la tête de spermatozoïde le long de sa trajectoire en ligne droite entre le premier et dernier point où il a été capturé. Il est calculé en trouvant la distance totale parcourue le long du chemin linéaire divisée par le temps d'acquisition.

Average Path Velocity (VAP) : exprimé en $\mu\text{m/s}$, c'est la vitesse moyenne dans le temps du centroïde de la tête du sperme le long de la trajectoire lissée, qui est construite en faisant la moyenne de plusieurs points sur la trajectoire curviligne réelle, le lissage se fait par des algorithmes de l'analyseur CASA ; ces algorithmes varient selon l'équipement, ce qui conduit à des variations de résultats entre divers systèmes et laboratoires. La VAP est calculé en divisant la longueur de la piste lissée par le temps d'acquisition.

Amplitude of Lateral Head Displacement (ALH) : exprimée en μm , définie comme l'amplitude du déplacement latéral de la tête du spermatozoïde par rapport à sa trajectoire moyenne et exprimée en maximum ou en moyenne de ces déplacements ; comme les algorithmes utilisés dans le calcul de ce paramètre varient d'un équipement à l'autre, ses valeurs peuvent ne pas être comparables entre divers systèmes et laboratoires.

Rectitude (STR) : définie comme le rapport VSL/VAP , qui exprime la linéarité du chemin moyen.

Beat Cross Frequency (BCF) : exprimée en Hz et fournissant la vitesse moyenne à laquelle le chemin curviligne croise le chemin moyen.

Mean Angular Displacement (MAD) : ou le déplacement angulaire moyen exprimé en $^\circ$ (degrés) et fournissant les valeurs absolues moyennées en temps de l'angle de rotation instantané de la tête du sperme le long de sa trajectoire curviligne.

Tableau N° 04: Définitions des trajectoires des spermatozoïdes (Amann et Graham 1993)

Paramètre	Abréviation	Définition
Vitesse de la trajectoire curvilinéaire	VCL (Velocity Curvilinear)	Vitesse de la trajectoire entre centroïdes dans un intervalle de temps défini
Vitesse de la trajectoire moyenne	VAP (Velocity Average Path)	Vitesse de la trajectoire lissée entre n positions du centroïde par intervalle de n temps
Vitesse de la trajectoire en ligne droite	VSL (Velocity Straightline)	Vitesse de la trajectoire entre 2 positions du centroïdes pris entre n intervalle de temps
Linéarité	LN (Linearity)	VSL/VCL
Rectitude	STR (Staightness)	VSL/VAP
Oscillation	WOB (Wobble)	VAP/VCL

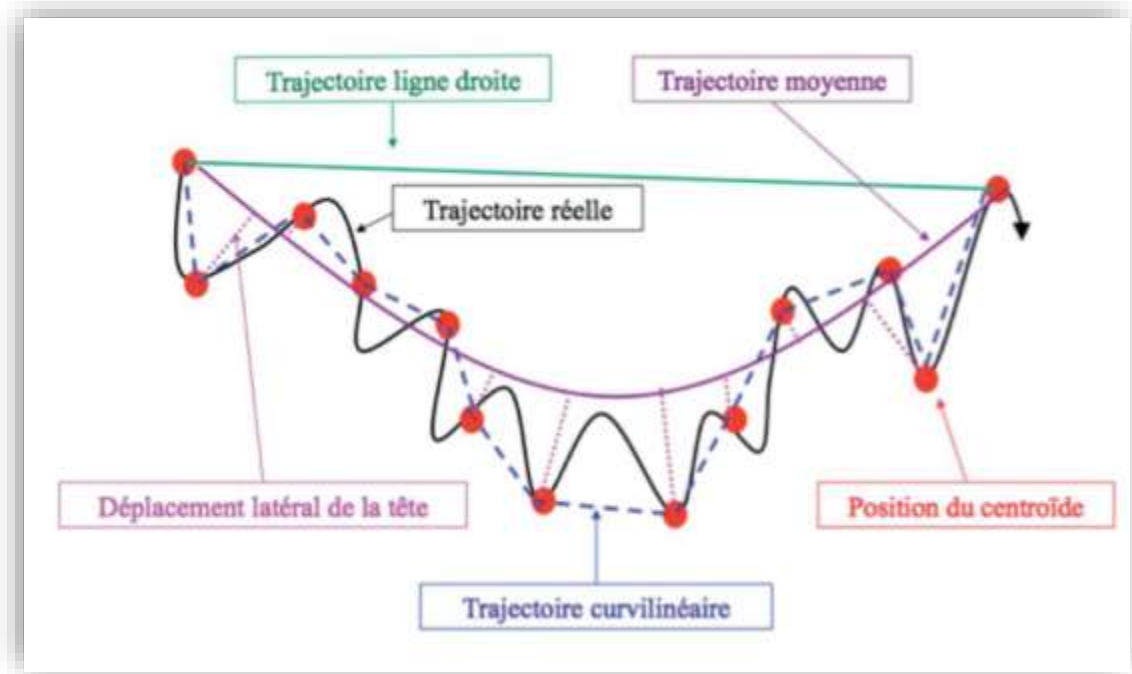


Figure N° 15: Les principales mesures cinématiques impliquées dans le suivi des spermatozoïdes (Ponthier et al. 2014).

3.3.1.4 Morphologie :

Les spermatozoïdes sont des cellules spécialisées très différenciées qui ont subis des modifications de forme et de taille. Le lien possible entre la morphologie des spermatozoïdes et la fertilité a déjà été reconnu depuis le milieu du siècle précédent (Macleod et Gold 1951). Cependant, la valeur prédictive de la morphologie des spermatozoïdes dans la fertilité masculine a toujours été une question controversée ; principalement en raison de la grande variabilité de l'évaluation manuelle de la morphologie au sein et entre les laboratoires, ce qui a ensuite limité son application pratique (Eustache et Auger, 2003 ; Maree et al., 2010 ; Van der Horst et Du Plessis, 2017).

La morphologie est un paramètre soumis à de fortes variations inter laboratoires, à tel point que certains la considèrent comme l'un des paramètres les plus subjectifs des tests spermatiques (Punjabi et al. 2016) et d'ailleurs certains s'interrogent sur son importance (Gatimel, Moreau, Parinaud, et Léandri, 2017).

Les auteurs ont révélé que les changements de classification et la modification standard dans les éditions successives de la classification de l'OMS ont tous joué un

rôle dans le maintien de ce paramètre en territoire flou. En fait, la première édition du manuel de l'OMS (1980) considérait un pourcentage normal de formes normales au-delà de 80%. Pour la deuxième édition (1987) et la troisième (1992), pourcentages étaient respectivement de 50% et 30%. La quatrième édition (1999) recommandait les critères stricts de Tygerberg qui sont limités aux têtes de sperme.

Ce paramètre était alors considéré comme normal au-dessus de 14% des formes normales. En 2010, la cinquième édition, tout en conservant la même procédure et la même classification, a une fois de plus changé le standard et considéré comme normale, la morphologie des spermatozoïdes au-dessus de 4% des formes normales (Menkveld, 2010) Ainsi, les valeurs standard ont considérablement évolué en 30 ans et la confiance en ce paramètre a nécessairement été minée.

3.3.1.5 Morphométrie :

Une mauvaise morphologie des spermatozoïdes a été associée à de faibles taux de fertilité (Chandler et al, 1988 ; Jasko et al. 1990 ; Barth et al. 1992). Cependant, les estimations subjectives de la morphologie des spermatozoïdes souffrent d'un manque de précision, de répétabilité et d'exactitude (Hidalgo et al. 2006). Par exemple, les programmes de contrôle de la qualité d'échantillons humains ont montré un coefficient de variation inter-technicien allant de 10 à 80% (Cooper et al., 2002 ; Alvarez et al., 2005 ; Filimberti et al., 2013).

Ces variations ont limité l'utilité d'une telle évaluation morphologique en tant que prédicteur de la qualité du sperme pour la reproduction (Ombelet et al., 1995).

Pour réduire la subjectivité de l'évaluation de la morphologie des spermatozoïdes, des systèmes d'analyse de la morphométrie des spermatozoïdes assistés par ordinateur (CASMA ou ASMA, génériquement CASA) ont été développés et sont apparus pour la première fois sur le marché dans les années 1990 (Davis et al., 1992 ; Kruger et al., 1993).

De nombreuses techniques peuvent évaluer la morphométrie des spermatozoïdes, mais CASA-Morph est devenu le choix principal pour cette tâche, car il offre une fiabilité et une répétabilité accrues et une subjectivité réduite. (Kruger et *al.*, 1999 ; Gago et *al.*, 1998 ; Yaniz et *al.*, 2015).

Les études qui évaluent les différentes sources de variation affectant CASA-Morph sont essentielles pour garantir sa répétabilité et cohérence entre les laboratoires.

Les principales sources de variation de CASA-Morph, autres que le logiciel et l'analyse des données, sont la préparation des échantillons, la méthode de fixation, la méthode de coloration, le système microscopique (optique et caméra) et le technicien. Toutes ces étapes peuvent affecter non seulement la répétabilité des expériences, mais également la reproductibilité et la comparaison des résultats entre laboratoires, qui sont nécessaires pour l'utilisation pratique des analyses morphométriques des spermatozoïdes.

PARTIE EXPERIMENTALE

III- MATERIELS ET METHODES

1. Lieux d'expérience :

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



Figure N° 16:la Plateforme (PBRC) de l'université de Blida1.

2. MATERIELS :

2.1. Matériel Biologique (figure n°17 annexe) :

Pour réaliser l'ensemble des expériences, nous avons utilisé la semence de 06 chiens nous avons prélevé vingt éjaculats à partir de six (06) chiens différents récoltés à 48 h d'intervalle minimal. Les chiens utilisés pour notre expérimentation sont illustrés dans l'annexe (Figure n° 17), (tableau n° 05) :

Tableau N° 05: identification de chaque animal.

Non de chien	Race	Age
CHOPPER	B.B.M	6 ans
ASCKO	B.B.M	10 ans
FIDEL	B.B.M	3 ans
TYRON	B.B.M	9 ans
LUCKY	B.B.M	13 ans
FAX	B.A	11 ans

2.2 Matériel divers :

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

2.2.1. Matériel de récolte de semence canine (figure n°18 voire annexe) :

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

2.2.1. Matériels d'examen initial de la semence (Figure n°17 ,20 voire annexe) :

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

2.2.1. L'analyseur Hamilton-Thorne IVOS II (figure n°21,22 ,23 voire annexe) :

- ✓ Il s'agit d'un système microphotographique. Il consiste en un dispositif incluant un matériel d'enregistrement microphotographique et en un support informatique pour la reconstruction et l'analyse des spz. Cette technique permet de générer un nombre considérable de paramètres obtenus grâce à l'analyse individuelle de chaque spermatozoïde.
- ✓ Chambre d'analyse LEJA ® à 4chambres de 20µm.

2.2.2. Matériels de microscopie optique standard (Figure n°18,25 voire annexe 01) :

- ✓ Un microscope optique de marque optica
- ✓ Lames porte-objet (dimensions)
- ✓ Lamelles couvre-objet de dimension
- ✓ Coloration Diff-Quick ® :
- ✓ Solution de montage commerciale (Eukitt®)
- ✓ Boîte de rangement de lames

2.2.3. Matériels de dilution et préparation de la semence(Figure n°19,31 voire annexe 01) :

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

3. METHODES

3.1. Récolte de la semence (Figure n°27,28 voire annexe 01):

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

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

3.2. Evaluation initiale de la semence :

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

3.2.1. Mobilité massale :

Une goutte de sperme frais est déposée sur une lame préchauffée et observée immédiatement au microscope à platine chauffée (+37°C) avec un faible grossissement(x100). Les mouvements par vagues, de réunion et de dispersion des spermatozoïdes sont appréciés et une note de 0 à 5 est alors attribuée selon l'échelle de MILOVANOVA.

3.2.2. Mobilité individuelle (Figure n°20 voire annexe 01) :

Une goutte de sperme dilué avec du liquide prostatique est déposée entre lame et lamelle et observée au grossissement (x400). Le pourcentage des spermatozoïdes fléchants (ayant des déplacements rapides en lignes droites) est apprécié subjectivement et une note est donnée entre 0 et 5 (0% - 100%).

Seulement les éjaculats possédant une mobilité individuelle de (60 – 70%) à plus sont inclus dans l'étude.

3.2.3. Mesure de la concentration des spermatozoïdes (Figure n°21 voire annexe 01):

La concentration des spermatozoïdes a été évaluée au moyen d'un photomètre étalonné pour le sperme canin (SDM Canine, Minitub, Allemagne). Après calibrage de l'appareil, la cellule de lecture est remplie d'une goutte de sperme pur puis chargée dans l'appareil. Le résultat est rendu en quelques secondes. Cet appareil avait déjà fait l'objet d'un étalonnage externe dans notre laboratoire au regard de la technique conventionnelle recommandée par l'OMS (Cellules de type amélioré de Neubauer).

3.3. Dilution de la semence (Figure n°31 voire annexe 01) :

En utilisons d'une solution tampon commerciale (Easy Buffer B, IM-Technologies, Aigles, France).

En fonction du volume (V1) et de la valeur de concentration initiale (C1) de l'éjaculat, un volume calculé de dilueur est ajouté pour avoir une concentration finale (C2) de 100 millions de spermatozoïdes par millilitre selon la relation $C1 \times V1 = C2 \times V2$.

3.4. Préparation de la lame pour l'étude morphologie conventionnelle (Figure n°32, 33, 34,35 voire annexe 01) :

Pour chaque lame de cytologie ont :

- 1- Identifier (non de chien, % de dilution, date de prélèvement)
- 2- Agiter les spz diluer avant de prendre la goutte à étudier
- 3- Rincer la pipete au milieu de l'épindolfe verticalement pour prendre un échantillon

- 4- Déposés 10 µl de sperme préalablement dilué en fonction de la concentration en spermatozoïdes selon un protocole précis décrit pour obtenir un nombre relativement constant de spermatozoïdes.
- 5- Les lames ont ensuite été colorées selon la méthode équivalente Diff-quick (kit RAL, CNL®) en accord avec les recommandations de l’OMS

3.5. Technique de coloration (Diff-Quik®) (figure n° 36 voire annexe 01) :

- 1-Verser les différentes solutions Diff-Quik dans des cuvettes de coloration a couvercle ou tout autre récipient adéquat.
- 2- Préparer les lames (étaier 10 µl de semence sur une dégraissée et laisser sécher a l’air).
- 3- Tremper la lame 15 seconde dans la réactive solution fixative I en laissant égoutter rapidement l’excédent à chaque fois.
- 4- Tremper la lame 15seconde dans la réactive solution colorante II en laissant égoutter rapidement l’excédent à chaque fois.
- 5- Tremper la lame15 seconde dans la réactive solution colorante III en laissant égoutter rapidement l’excédent à chaque fois.
- 6- Rincer la lame a l’eau distillée.
- 7- Laisser sécher à l’air et examiner.

3.6 Montage et conservation des lames (Figure n°22 voire annexe 01) :

Après coloration et séchage, le lames ont été montées au moyen d’une solution commerciale (Eukitt®, SIGMA-ALDRICH) et des lamelles couve-objet. Le montage a été effectué afin d’améliorer la qualité de leur lecture microscopique d’une part et de pouvoir les conserver le plus longtemps possible pour éventuellement d’autres lectures ou un contrôle de qualité en vigueur au niveau du laboratoire d’étude. Une fois montées, ces lames ont été rangées dans des boites de rangement de lames et conservées jusqu’à exploitation.

3.7. La lecture au microscope optique :

La lecture se faite par grossissement 40 puis au grossissement 100 en utilisons un oïl spéciale (IMMERSION OIL) pour facilite la bonne vision des spz.

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

3.8.1. Description :

L'analyse informatique de la semence a été effectuée au moyen d'un système Hamilton Thorne IVOS II version 1.11.3 appartenant au laboratoire d'analyse spermatique de la PBRC/UB1, et une lame d'analyse Léja® à quatre chambres de 20µl d profondeur (Voir figure n° 21).

Ce système se compose d'un microscope à contraste de phase négative et à platine chauffante et d'une caméra, relié à un logiciel d'analyse d'image IVOS II (Voir figure n°22 ,23).

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

- ✓ La lame utilise pour l'analyse de sperme sur la machine CASA nommé Leja.
- ✓ Dilution de l'éjaculat par une solution tampon du commerce (EasyBuffer B, IMV-Technologies) jusqu'à une concentration d'analyse comprise entre 20 à 30 millions spz/ml, selon les recommandations du fabricant.
- ✓ Le préchauffage de la lame Léjà (platine histologique à 37°C)
- ✓ Préparation du système (température de la platine à 37°C ; choix du setup canin.
- ✓ Mise de la lame en porte lame du système.
- ✓ Remplissage de la lame par 3µl de semence diluée dans une chambre (A, B, C, D) au moyen d'une micropipette P20 et un embout adapté.
- ✓ Pour chaque échantillon, 8 champs ont été enregistrés et analysés.
- ✓ Les paramètres mesurés comprenaient :
 - motilité totale (%)
 - motilité progressive (%)
 - anomalies morphologiques : queue courbée, queue enroulée, gouttelette proximale, gouttelette distale et réflexe distal de la pièce médiane (DMR)
 - la concentration
 - paramètres cinématiques : amplitude du déplacement latéral de la tête (ALH, µm), vitesse curviligne (VCL, µm/s), vitesse en ligne droite (VSL, µm/s), vitesse moyenne de trajectoire (VAP, µm/s), linéarité (LIN=VSL/VCL, %), oscillation (WOB=VAP/VCL, %) et rectitude (STR=VSL/VAP, %).
- ✓ Toutes les analyses de sperme ont été capturées sur cette machine IVOS II a été enregistrée sous forme d'enregistrement vidéo.

- ✓ Ces vidéos sont ensuite été réanalysées en appliquant des différents paramètres
- ✓ L'exportation des données est souple, l'opérateur sélectionne les paramètres à exporter. L'extraction des données au format ASCII peut concerner une période, un animal, une ligne génétique. Les données peuvent être exportées en temps réel vers un logiciel de production intégré qui permet de limiter les saisies pour une parfaite traçabilité.

3.8.2. Les paramètres morphométriques générés par le système HT-IVOS II :

Les paramètres morphométriques analysés par ce système et utilisés dans notre étude sont :

- ✓ Bent Tail (Queue courbée)
- ✓ Coiled Tail (Queue enroulée)
- ✓ DMR (Réflexes de la pièce médiane distale)
- ✓ Proximal Droplet (Gouttelette proximale)
- ✓ Distal Droplet (Gouttelette distale)

Morph				
	Count	Sample	Concentration	Percent Of Total
		M	M/ml	
Bent Tail	8	7	4.66	4.20
Coiled Tail	3	3	1.75	1.60
DMR	0	0	0.00	0.00
Distal Droplet	0	0	0.00	0.00
Proximal Droplet	1	1	0.58	0.50
			Normal Fraction:	94.20 %

Figure N° 37 : paramètres morpho. Prise par le système CASA IVOS II

4. Protocole expérimental (voir annexe 08) :

Dans cette étude, 20 éjaculats ont été récoltés à partir de 6 chiens (Voir tableau n° 05). Chaque éjaculat a été soumis à un contrôle de qualité initial évaluant la mobilité massale, et individuelle ainsi que la concentration spermatique.

Chaque éjaculat remplissant les conditions d'inclusion dans l'étude (§ section 3.2 .2.) est dilué comme décrit précédemment (§ dilution 3.2.3) pour être analysé par le système HT-IVOS II dans deux conditions différentes (spz mobiles « MOB » et statiques « STAT ») et par la microscopie standard (coloration Diff Quick®).

L'analyse informatique de l'éjaculat a été faite selon le paramétrage (Setup) recommandé par le fabricant (Voir Annexe n° 02.) et le résultat d'analyse a été enregistré sous forme de vidéo. Cette dernière a été par la suite ré analysée suivant plusieurs paramétrages (setup) expérimentaux résultant de la variation de deux paramètres de détection cellulaire à savoir la brillance minimale (HBM, pou Head Brightness Minimum) ainsi que la surface (Area, μm^2) de la tête du spz.

Dans un but d'optimisation et de standardisation du setup d'analyse informatique par le système HT-IVOS II, ces deux facteurs (HBM et Area) ont été variés comme suit : (HBM : 100, 120, 140, 160, 180, 200 ; Area : 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14). Ce protocole expérimental est représenté graphiquement par l'annexe n° 08.

Les 20 vidéos enregistrées des 20 éjaculats étudiés (n=20) ont été réanalysées selon le protocole ci-dessus, ce qui a permis l'obtention de **1120 analyses IVOS II**.

5. Saisie des données

Les données brutes des 1120 analyses IVOS II ont été récupérées du système puis saisie sur un fichier Excel comportant un tableau de 10 colonnes (pour 7 paramètres morphométriques et 3 facteurs de variation étudiée) et 1120 lignes représentant le nombre d'analyse effectuées de notre étude.

6. Analyse statistique :

L'analyse statistique des données brutes des 20 éjaculats (n=20) et 1120 analyses IVOS II a été effectuée par le logiciel IBM – SPSS version 25, © 2017.

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

- ANOVA et les tests de Tukey et de Duncun en post hoc.
- Corrélation de Pearson
- Régression linéaire

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

IV- RESULTATS

1. Effet des paramètres de détection cellulaire sur la morphométrie :

1.1. La brillance minimale de la tête du spz (HBM)

1.1.1. Effet sur les taux de normozoospermie et térazoospermie :

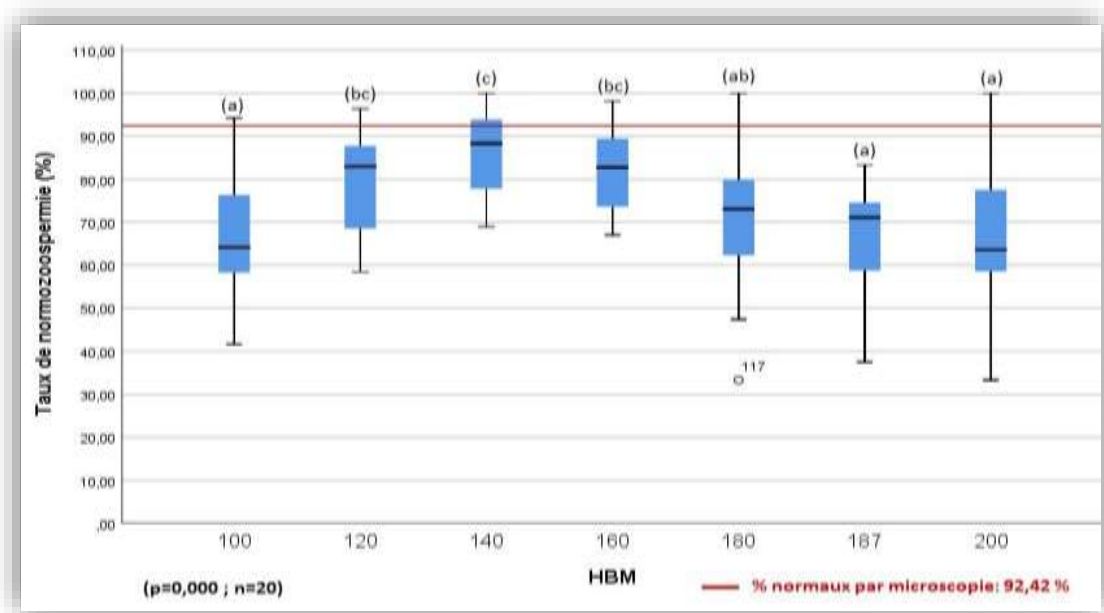


Figure N° 38: Effet de variation « 100-200 » de la brillance minimale « HBM » sur le taux de normozoospermie des spz canins analysés par le système HT-IVOS II avec Area fixée à $16\mu\text{m}^2$. Des lettres différentes signifient une différence très hautement significative à $p=0.000$ ($n=20$).

Tableau N° 06 : Taux moyens de normozoospermie de 20éjaculats canins analysés par le système HT-IVOS II à plusieurs valeurs « 100-200 » de brillance minimale de la tête du spz « HBM » et à une « Area » fixée à $16\mu\text{m}^2$ ($n=20$).

	N	Moyenne	Ecart type	Erreur standard
100	20	66,3300	14,79236	3,30767
120	20	79,5300	11,41375	2,55219
140	20	85,9150	9,56002	2,13769
160	20	82,3150	9,22087	2,06185
180	20	71,2250	15,87152	3,54898
187	20	66,2700	12,26549	2,74265
200	20	65,6150	15,69547	3,50961

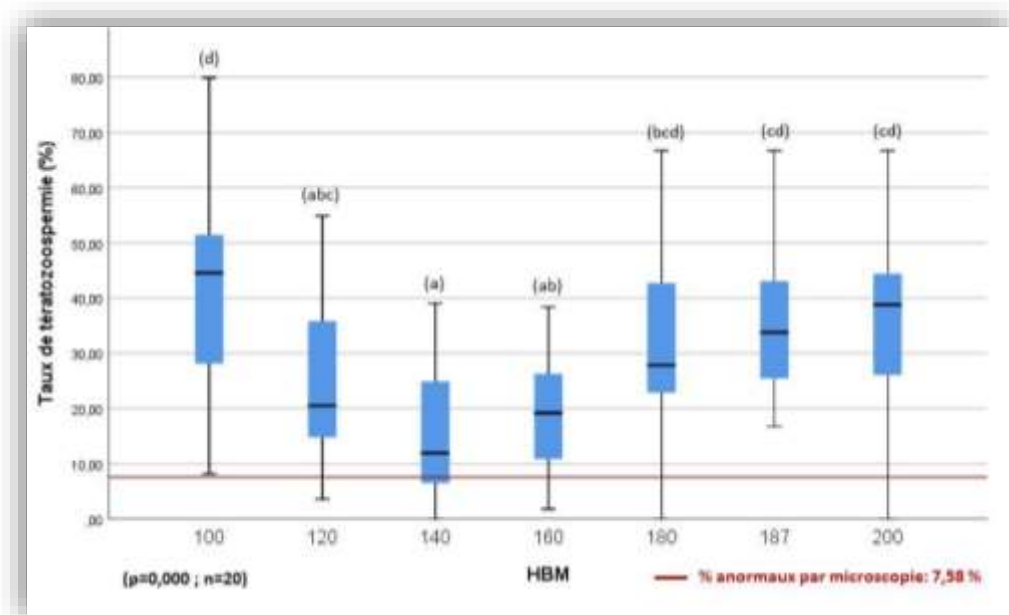


Figure N° 39 : Effet de variation « 100-200 » de la brillance minimale « HBM » sur le taux de tératozoospermie des spz canins analysés par le système HT-IVOS II avec Area fixée à 16 μ m². Des lettres différentes signifient une différence très hautement significative à p=0.000 (n=20).

Tableau N° 07 : Taux moyens de tératozoospermie de 20éjaculats canins analysés par le système HT-IVOS II à plusieurs valeurs « 100-200 » de brillance minimale de la tête du spz « HBM » et à une « Area » fixée à 16 μ m² (n=20).

	N	Moyenne	Ecart type	Erreur standard	Minimum	Maximum
100	20	41,1650	17,92512	4,00818	8,20	79,90
120	20	24,5150	13,50178	3,01909	3,60	54,90
140	20	15,4400	11,22072	2,50903	,00	39,10
160	20	18,7800	10,16250	2,27240	1,80	38,40
180	20	30,9700	17,23613	3,85412	,00	66,70
187	20	35,8150	12,88019	2,88010	16,70	66,70
200	20	37,3250	17,15192	3,83529	,00	66,70

1.1.2. Effet sur les taux de Gouttelette Proximale et Flagelle enroulé

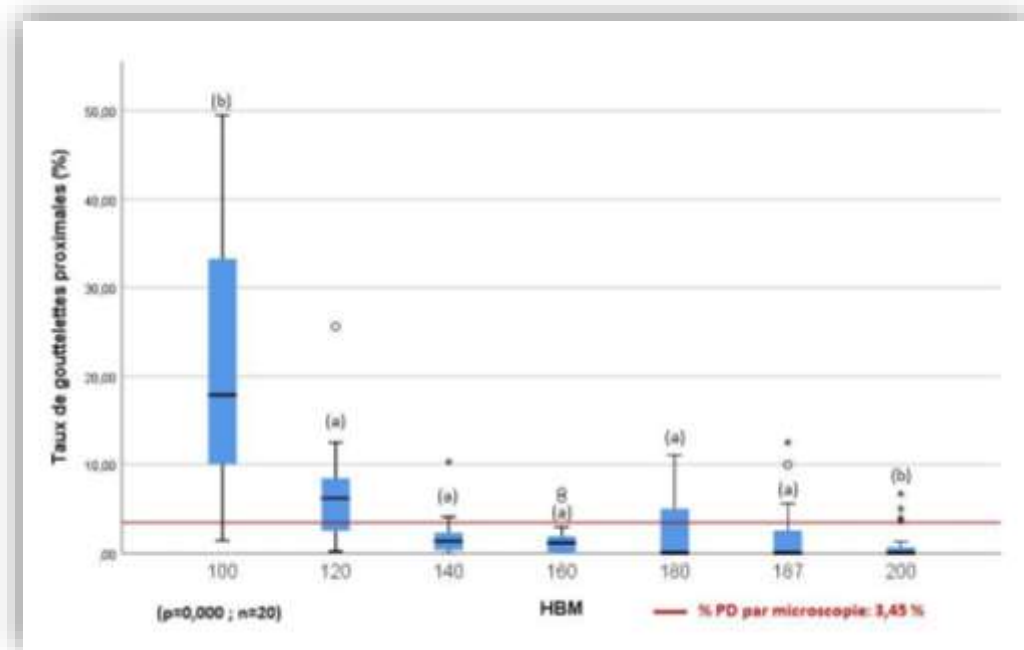


Figure N° 40 : Effet de variation « 100-200 » de la brillance minimale « HBM » et « Area » fixée à $16\mu\text{m}^2$ sur le taux des spz canins présentant une Gouttelette Proximale (PD, proximal Droplet) après analyse par le système HT-IVOS II. Des lettres différentes signifient une différence très hautement significative à $p=0.000$ ($n=20$).

Tableau N° 08 : Taux moyens de Gouttelette Proximale (PD, proximal Droplet) de 20 éjaculats canins analysés par le système HT-IVOS II à plusieurs valeurs « 100-200 » de brillance minimale de la tête du spz « HBM » et à une « Area » fixée à $16\mu\text{m}^2$ ($n=20$).

	N	Moyenne	Ecart type	Erreur standard	Borne inférieure	Borne supérieure
100	20	22,6100	15,60273	3,48888	15,3077	29,9123
120	20	6,4050	5,68992	1,27231	3,7420	9,0680
140	20	1,7750	2,31104	,51676	,6934	2,8566
160	20	1,5100	1,94203	,43425	,6011	2,4189
180	20	2,2150	3,22332	,72076	,7064	3,7236
187	20	1,9200	3,59965	,80491	,2353	3,6047
200	20	1,0300	2,04324	,45688	,0737	1,9863

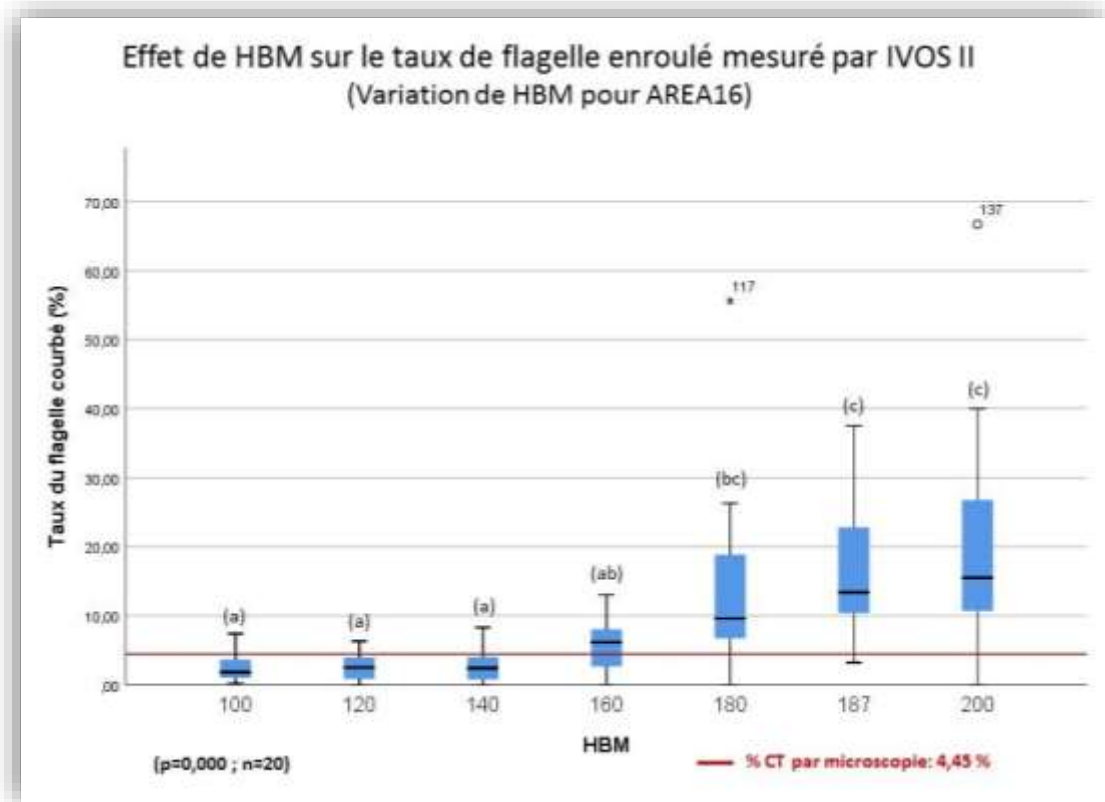


Figure N° 41 : Effet de variation « 100-200 » de la brillance minimale « HBM » et « Area » fixée à 16µm² sur le taux des spz canins présentant un Flagelle enroulé (CT, Coiled Tail) après analyse par le système HT-IVOS II. Des lettres différentes signifient une différence très hautement significative à p=0.000 (n=20).

Tableau N° 09: Taux moyens de Flagelle enroulé (CT, CoiledTail) de 20éjaculats canins analysés par le système HT-IVOS II à plusieurs valeurs « 100-200 » de brillance minimale de la tête du spz « HBM » et à une « Area » fixée à 16µm² (n=20).

HBM	Moyenne	Ecart type	Erreur standard de la moyenne	Minimum	Maximum
100	2,4850	2,06939	,46273	,20	7,40
120	2,6200	1,94547	,43502	,00	6,30
140	2,6650	2,26001	,50535	,00	8,30
160	5,5150	3,45547	,77267	,00	13,00
180	13,1550	12,76275	2,85384	,00	55,60
187	16,7900	9,47722	2,11917	3,20	37,50
200	19,9900	15,77780	3,52802	,00	66,70
Total	9,0314	10,95819	,92614	,00	66,70

1.2. La taille minimale de la tête du spz (AREA, μm^2)

1.2.1. Effet sur les taux de normozoospermie et de tératozoospermie

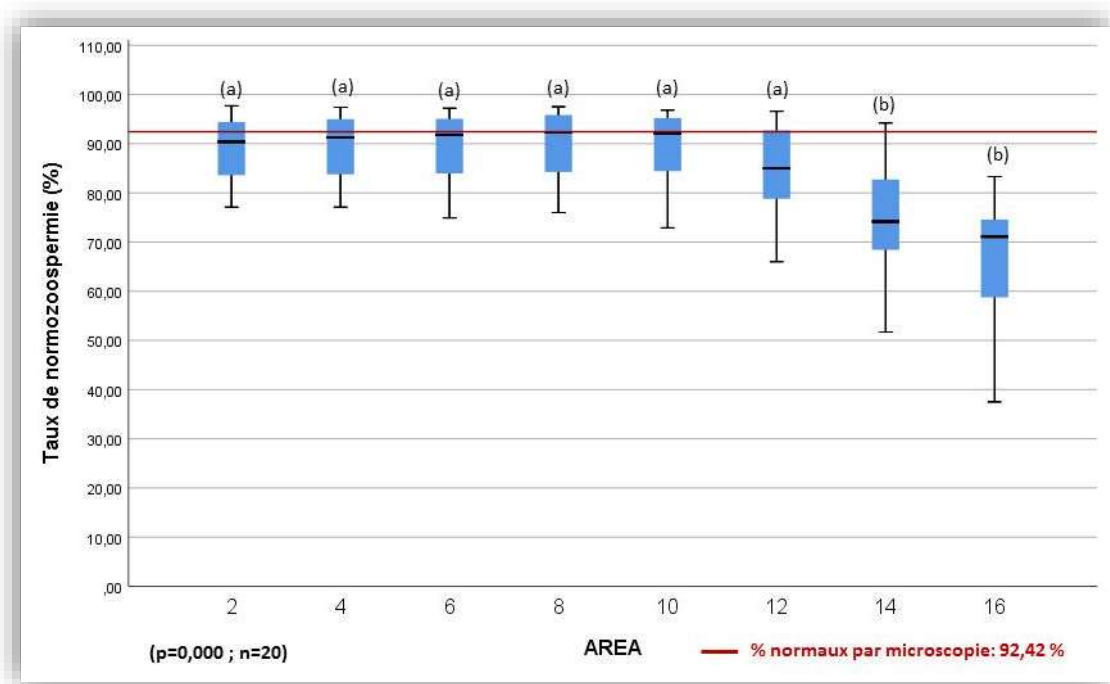


Figure N° 42 : Effet de variation « 2-16, μm^2 » de la taille minimale du spz « AREA » avec la brillance minimale « HBM » fixée à 187 sur le taux de normozoospermie des spz canin analysés par le système HT-IVOS II. Des lettres différentes signifient une différence très hautement significative à $p=0.000$ ($n=20$).

Tableau N° 10 : Taux moyens de normozoospermie de 20 éjaculats canins analysés par le système HT-IVOS II à plusieurs valeurs « 2-16, μm^2 » de taille minimale de la taille du spz « AREA » et à une brillance minimale « HBM » fixée à 187 ($n=20$).

	N	Moyenne	Ecart type	Erreur standard	Borne inférieure	Borne supérieure
2	20	89,2800	6,06253	1,35562	86,4426	92,1174
4	20	89,8450	6,16104	1,37765	86,9615	92,7285
6	20	89,9850	6,39813	1,43067	86,9906	92,9794
8	20	90,3500	6,56959	1,46900	87,2753	93,4247
10	20	89,4750	7,06011	1,57869	86,1708	92,7792
12	20	84,4300	9,11997	2,03929	80,1617	88,6983
14	20	74,3500	10,61065	2,37261	69,3841	79,3159
16	20	66,2700	12,26549	2,74265	60,5296	72,0104

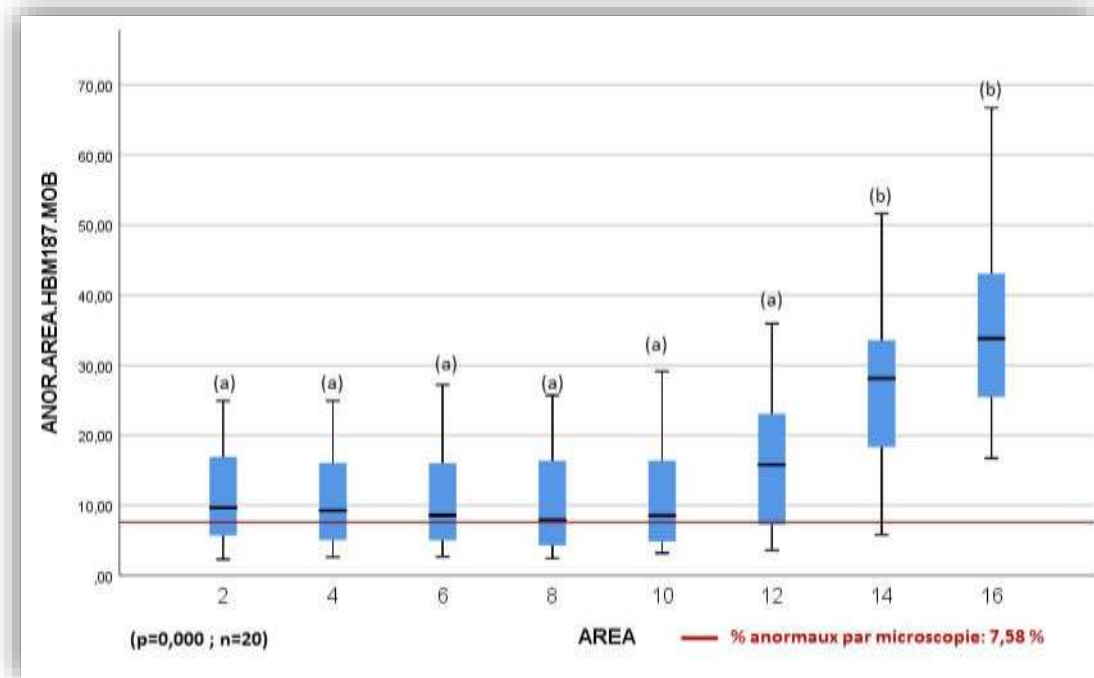


Figure N° 43 : Effet de variation « 2-16, μm^2 » de la taille minimale du spz « AREA » avec la brillance minimale « HBM » fixée à 187 sur le taux de tératozoospermie des spz canin analysés par le système HT-IVOS II. Des lettres différentes signifient une différence très hautement significative à $p=0.000$ ($n=20$).

Tableau N° 11: Taux moyens de tératozoospermie de 20 éjaculats canins analysés par le système HT-IVOS II à plusieurs valeurs « 2-16, μm^2 » de taille minimale de la taille du spz « AREA » et à une brillance minimale « HBM » fixée à 187 ($n=20$).

	N	Moyenne	Ecart type	Erreur standard	Minimum	Maximum
2	20	10,7100	6,27123	1,40229	2,30	24,90
4	20	10,1400	6,34768	1,41938	2,60	24,90
6	20	10,0450	6,58415	1,47226	2,70	27,20
8	20	9,9750	6,90125	1,54317	2,40	25,70
10	20	11,0050	7,53905	1,68578	3,20	29,10
12	20	16,0850	10,01295	2,23896	3,60	35,90
14	20	27,4200	11,59726	2,59323	5,80	51,60
16	20	35,8150	12,88019	2,88010	16,70	66,70

1.2.2. Effet sur les taux de flagelle courbé

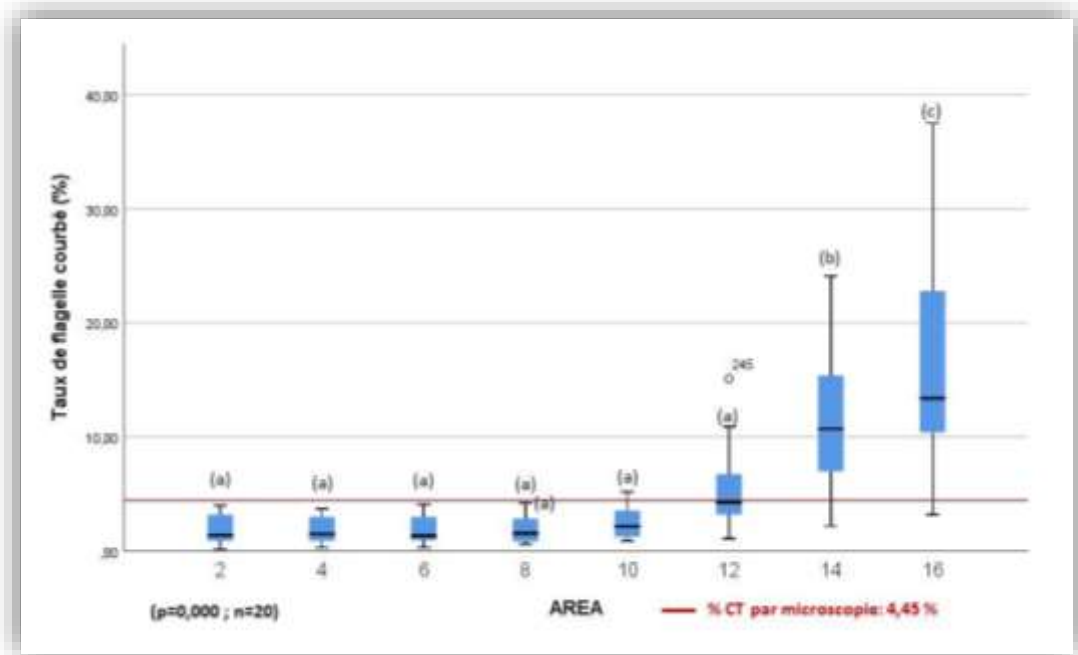


Figure N° 44 : Effet de variation « 2-16, μm^2 » de la taille minimale de la tête du spz « AREA » et HBM fixé à $140\mu\text{m}^2$ sur le taux des spz canins présentant un Flagelle enroulé (CT, Coiled Tail) après analyse par le système HT-IVOS II. Des lettres différentes signifient une différence significative à $p=0.000$ ($n=20$).

Tableau N° 12: Taux moyens de Flagelle enroulé (CT, CoiledTail) de 20 éjaculats canins analysés par le système HT-IVOS II à plusieurs valeurs « 2-16, μm^2 » de taille minimale de la taille du spz « AREA » et à une brillance minimale « HBM » fixée à 187 ($n=20$).

AREA	Moyenne	Ecart type	Erreur standard de la moyenne	Minimum	Maximum
2	1,8650	1,24869	,27922	,20	4,00
4	1,8350	1,11510	,24934	,30	3,70
6	1,9350	1,24363	,27808	,30	4,10
8	1,9750	1,20170	,26871	,60	4,20
10	2,4650	1,35541	,30308	,90	5,20
12	5,4550	3,33285	,74525	1,10	15,10
14	11,4900	5,86478	1,31141	2,20	24,10
16	16,7900	9,47722	2,11917	3,20	37,50
Total	5,4762	6,73055	,53210	,20	37,50

1.3. Etude de corrélation entre IVOS II et microscopie classique

Une étude de corrélation de Pearson a été effectuée pour les taux de normozoospermie (Annexe n° 03), la gouttelette Proximale (Annexe n° 04) et le Flagelle Enroulé (Annexe n° 05) entre d'une part la microscopie classique considérée comme étant la technique de référence, et de l'autre côté l'HT-IVOS II avec différents paramétrages de détection cellulaire à savoir HBM186-AREA16 (recommandé par le fabricant), HBM140-AREA6 ; HBM140-AREA4 ; HBM120-AREA4 ; HBM120-AREA4. Les résultats sont consignés sur des tableaux de corrélation présentés en annexes n° 03-05 respectivement pour les paramètres cités ci-dessus.

A partir de ces résultats pour la normozoospermie, et le taux du Flagelle Enroulé, une comparaison a été faite entre la microscopie et l'IVOS II avec HBM140-AREA4 par confrontation des deux courbes de régression linéaire présentée ci-dessous en figures n° 45-46.

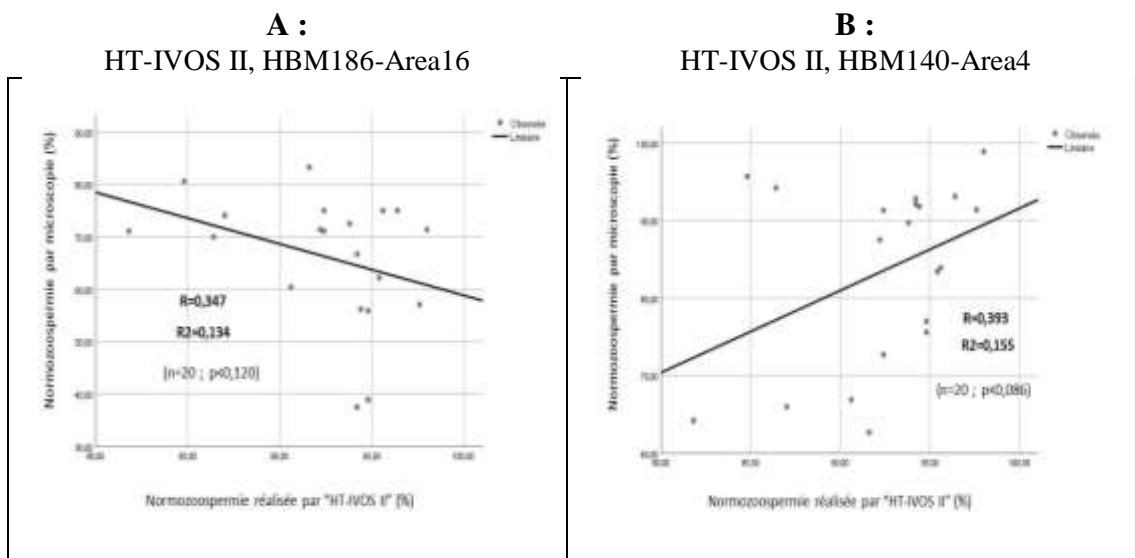


Figure N° 45 : Droite de régression linéaire entre le taux de normozoospermie des spz canins évalué par la microscopie classique et le système HT-IVOS II et le paramétrage A : « HBM : 187 ; AREA : 16 μ m² ; R=-0.347 ; p=0.134 ; n=20 » et B : « HBM : 140 ; AREA : 4 μ m² ; R= +0.393 ; p=0.134 ; n=20 ».

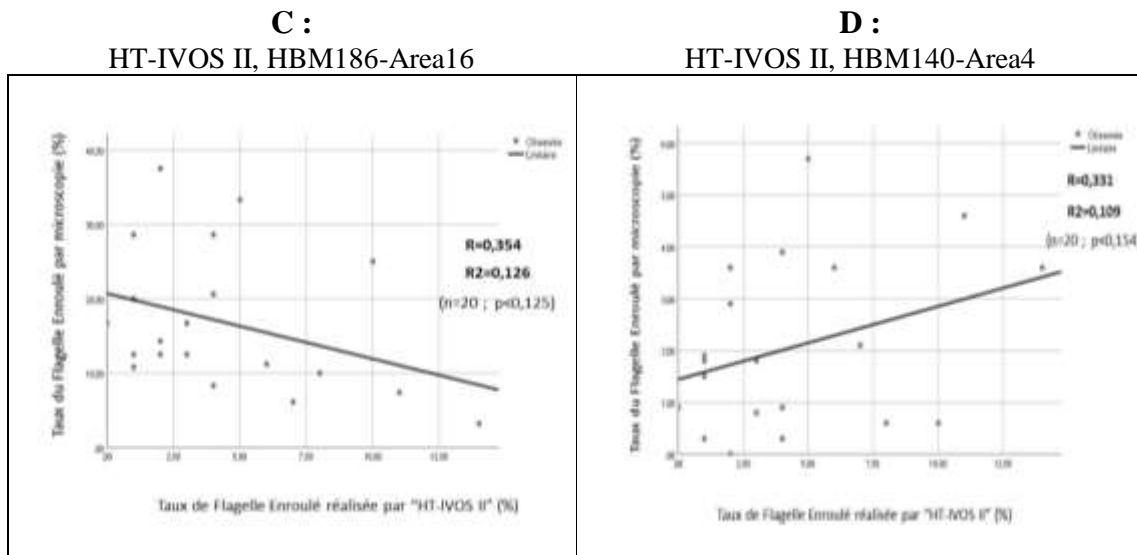


Figure N° 46 : Droite de régression linéaire entre le taux de Flagelle Enroulé (PD) des spz canins évalué par la microscopie classique et le système HT-IVOS II et le paramétrage C : « HBM : 187 ; AREA : 16 μ m² ; R= -0.354 ; p=0.126 ; n=20 » et D : « HBM : 140 ; AREA : 4 μ m² ; R= +0.331 ; p=0.154 ; n=20 ».

2. Effet de l'immobilisation des spz sur la concentration et la morphométrie

Effet sur la concentration

Tableau N° 13: Concentration analysée par le système HT-IVOS II avec plusieurs paramétrages avec spz mobile (1) et immobilisés avant analyse (2) (n=1120).

MOB.STAT	Moyenne	N	Erreur standard de la moyenne	Minimum	Maximum
1	199,3215	560	8,84317	1,02	1196,02
2	284,2014	560	12,34141	1,17	1844,74
Total	241,7614	1120	7,69325	1,02	1844,74

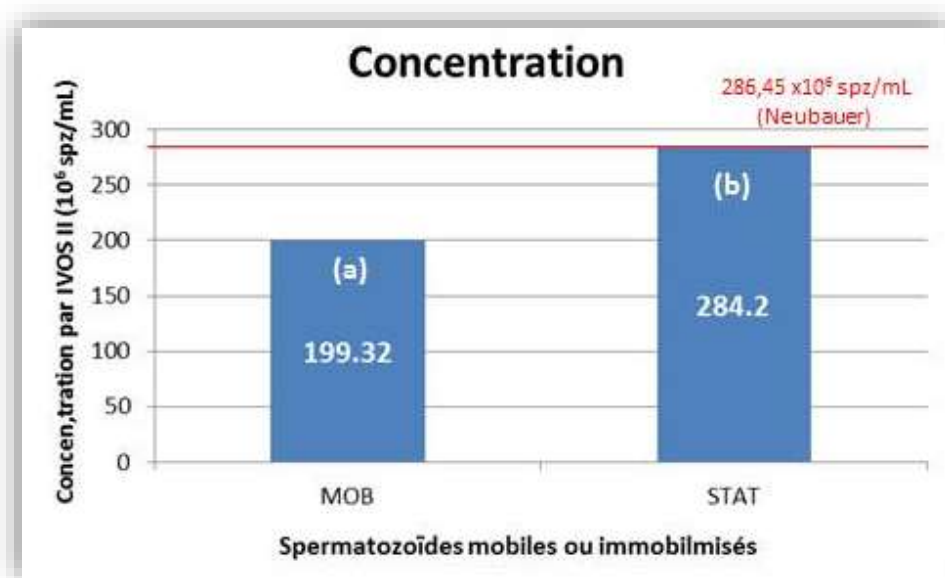


Figure N° 47 : Concentration analysée par le système HT-IVOS II avec plusieurs paramètres avec spz mobile (1) et immobilisés avant analyse (2). A et b indique une DS à $p=0.000$ ($n=1120$).

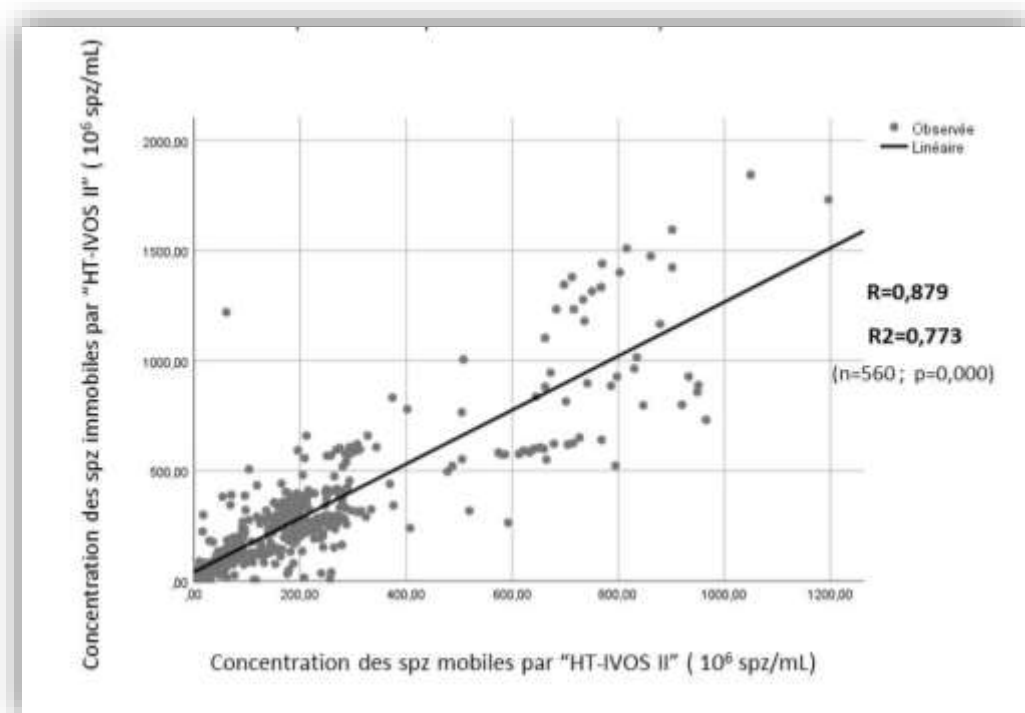


Figure N° 48 : Droite de régression linéaire entre la concentration des spz canins évalué par numération cellulaire (Neubauer) et le système HT-IVOS II avec différents paramètres.

Tableau N° 14: Tableau des corrélations entre les concentrations mesurées par numération cellulaire « Neubauer » et par le système HT-IVOS II avec plusieurs paramétrages (HBM187-AREA16 ; HBM140-AREA4) avec spz mobile (MOB) et immobilisés avant analyse (STAT) (n=20).

Corrélations						
		CONC.NB	CONC.187.16.MOB	CONC.187.16.STAT	CONC.140.4.MOB	CONC.140.4.STAT
CONC.NB	Corrélation de Pearson	1	,792**	,743**	,929**	,920**
	Sig. (bilatérale)		,000	,000	,000	,000
	N	20	20	20	20	20
CONC.187.16.MOB	Corrélation de Pearson	,792**	1	,938**	,734**	,833**
	Sig. (bilatérale)	,000		,000	,000	,000
	N	20	20	20	20	20
CONC.187.16.STAT	Corrélation de Pearson	,743**	,938**	1	,716**	,797**
	Sig. (bilatérale)	,000	,000		,000	,000
	N	20	20	20	20	20
CONC.140.4.MOB	Corrélation de Pearson	,929**	,734**	,716**	1	,871**
	Sig. (bilatérale)	,000	,000	,000		,000
	N	20	20	20	20	20
CONC.140.4.STAT	Corrélation de Pearson	,920**	,833**	,797**	,871**	1
	Sig. (bilatérale)	,000	,000	,000	,000	
	N	20	20	20	20	20

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

Tableau N° 15: Moyennes de concentrations mesurées par numération à la cellule de Neubauer « CONC.NB » et par le système HT-IVOS II avec plusieurs paramétrages (HBM187-AREA16 ; HBM140-AREA4) avec spz mobile (MOB) et immobilisés avant analyse (STAT) (n=20).

Statistiques descriptives			
	Moyenne	Ecart type	N
CONC.NB	286,4495	198,34548	20
CONC.187.16.MOB	19,7650	39,99382	20
CONC.187.16.STAT	23,2000	27,98582	20
CONC.140.4.MOB	292,5410	248,19334	20
CONC.140.4.STAT	399,0330	326,90742	20

Effet sur la morphométrie

Tableau N° 16 : Moyennes de normozoospermie analysés par microscopie « TOTAL.NORM.MIC » et par le système HT-IVOS II avec plusieurs paramétrages (HBM187-AREA16 ; HBM140-AREA4) avec spz mobile (MOB) et immobilisés avant analyse (STAT) (n=20).

	N	Minimum	Maximum	Moyenne	
	Statistiques	Statistiques	Statistiques	Statistiques	Erreur standard
NORM.MOB	560	33,30	100,00	80,6830	,53453
NORM.STAT	560	,00	95,30	68,4957	,74751
NORM.187.16.MOB	20	38,90	80,60	64,7100	2,59343
NORM.187.16.STAT	20	35,70	82,60	58,6800	3,00350
NORM.140.4.MOB	20	64,10	140,00	87,4650	3,60668
NORM.140.4.STAT	20	54,50	92,20	76,1450	2,45434
TOTAL.NORM.MIC	20	81,80	98,00	92,4200	,96898

Tableau N° 17 : Tableau des corrélations entre les taux de normozoospermie analysés par microscopie et par le système HT-IVOS II avec plusieurs paramétrages (HBM187-AREA16 ; HBM140-AREA4) avec spz mobile (MOB) et immobilisés avant analyse (STAT) (n=20).

Corrélations						
		TOTAL.NOR M.MIC	NORM.187. 16.MOB	NORM.187.1 6.STAT	NORM.140. 4.MOB	NORM.140.4. STAT
TOTAL.NORM.MIC	Corrélation de Pearson	1	-,251	,237	,230	,542 [*]
	Sig. (bilatérale)		,286	,314	,329	,013
	N	20	20	20	20	20
NORM.187.16.MOB	Corrélation de Pearson	-,251	1	,327	,324	,127
	Sig. (bilatérale)	,286		,160	,164	,594
	N	20	20	20	20	20
NORM.187.16.STAT	Corrélation de Pearson	,237	,327	1	,080	,623 ^{**}
	Sig. (bilatérale)	,314	,160		,736	,003
	N	20	20	20	20	20
NORM.140.4.MOB	Corrélation de Pearson	,230	,324	,080	1	,477 [*]
	Sig. (bilatérale)	,329	,164	,736		,033
	N	20	20	20	20	20
NORM.140.4.STAT	Corrélation de Pearson	,542 [*]	,127	,623 ^{**}	,477 [*]	1
	Sig. (bilatérale)	,013	,594	,003	,033	
	N	20	20	20	20	20
* . La corrélation est significative au niveau 0.05 (bilatéral).						
** . La corrélation est significative au niveau 0.01 (bilatéral).						

V- DISCUSSION

La morphologie du spermatozoïde constitue un paramètre important dans l'exploration de la qualité du sperme et son pouvoir fertilisant. En effet, elle affecte la capacité du spz à atteindre le site de fécondation dans le tractus génital femelle à féconder l'ovocyte et à initier l'embryogenèse (Saacke, 2008).

Ce paramètre est classiquement évalué par observation microscopique après fixation et coloration sur lames porte-objet. Cette technique est assez précise sous condition d'expérience de l'opérateur, mais nécessite beaucoup de temps pour sa réalisation et implique la mobilisation du personnel de laboratoire, et induit la fatigue visuelle qui est source probable d'erreur. Cette technique classique peut aussi souffrir de subjectivité quand elle n'est pas réalisée par une personne hautement expérimentée (Auger et Eustache, 2000).

L'analyseur assisté par ordinateur a été introduit comme alternative à la méthode classique et présente l'avantage de la rapidité, la précision, l'automatisation qui pourrait permettre d'éviter les erreurs humaines et mieux standardiser cette analyse (Rijsselaere et al, 2013).

Cette technique est appelée CASMA (pour Computer Aided Sperm Morphometric Analysis), elle est effectuée par un système CASA qui analyse la morphologie des spz séparément de la mobilité sur des lames de frottis cellulaire fixées et colorées. La morphométrie utilise donc un logiciel différent de celui de la mobilité et un système d'illumination en champs clair. Ce logiciel de CASMA effectue la capture individuelle et la mesure des différentes parties du spz grâce à leur coloration différentielle (Vander horst et al., 2014). Cette technique a été largement évaluée et validées pour plusieurs systèmes et plusieurs espèces animales (Buendia et al., 2002 ; Hidalgo et al., 2005, 2006 ; Maroto-Morales et al., 2010 ; Vander horst *et al.*, 2014 ; Estezo et al., 2015).

Par ailleurs, certains systèmes récents comme le HT-IVOS II, permettent l'analyse morphométrie automatique au même temps que la mobilité, donc avec le même logiciel d'analyse et le même système d'illumination à contraste de phase négative. Comparée à la morphométrie sur lames colorées, la morphométrie automatique pourrait ainsi offrir l'avantage de rapidité, du moindre coût d'analyse et du nombre important de spz analysés.

Elle permet également d'éviter la fixation et la coloration des spz, déjà identifiées comme facteurs d'erreur dans la morphométrie sur lames colorées (Hidalgo et al, 2005 ; Vander horst *et al.*, 2014).

Cependant, si la morphométrie sur lame colorée, a été largement étudiée et semble avoir été validée pour plusieurs système CASA par comparaison à la technique de référence recommandée par l'OMS (Buendia et al., 2002 ; Hidalgo et al., 2005, 2006 ; Maroto-Morales et al., 2010 ; Vander horst *et al.*, 2014 ; Estezo et al., 2015), il n'en est malheureusement pas de même pour la morphométrie automatique sans coloration. Le système CASA fonctionne grâce à un ensemble de paramètres qui ne sont autre que les résultats de définition des seuils utilisés par le logiciels pour d'abord détecter les spz (Brillance « contraste », taille et élongation de la tête du spz, ...) et les classer en plusieurs catégories de mobilité (statiques, mobile, progressifs, ...) ainsi que de morphologie (taux de normozoospermie « % des spz normaux », taux de térazoospermie « % des anormaux » et la typologie et pourcentages des anomalies). On parle alors de paramétrage « setting » de détection cellulaire, cinématique et morphométrique respectivement.

Très récemment, O'meara et ses collaborateur (2021) ont étudié l'effet d'ajustement du paramétrage morphométrique du système HT-IVOS II sur les pourcentages d'anomalies des spz bovins congelés (O'méara et al., 2021). Dans cette étude, les changements de paramétrage morphométrique évaluées n'ont pas eu d'effets très significatifs sur les résultats d'analyse.

Etant donné que la morphométrie automatique, contrairement à celle sur lames colorées, analyse les spz au même temps que la mobilité et avec le même système d'illumination, elle dépend alors du paramétrage de détection cellulaire car si un spz n'a pas été détecté en tant que tel, il ne sera pas analysé en morphométrie, ce qui influe directement sur les proportions des différentes anomalies et par conséquent sur les taux de normo et térazoospermie.

Ainsi, l'hypothèse avancée dans notre travail est que, les paramètres de détection cellulaire, notamment la brillance (contraste) et la taille de la tête du spz peuvent avoir un impact sur l'analyse de la morphologie par le système HT-IVOS II. A la limite de notre connaissance, aucune étude n'a encore porté sur cet objectif.

Les paramètres de détection cellulaire étudiés dans ce travail sont les seuils « minimum » de brillance (contraste) et de taille (AREA, μm^2) de la tête du

spermatozoïde canin et leur effet sur la capacité du logiciel d'analyse d'image à détecter et analyser ces cellules.

La brillance minimale de la tête (HBM, pour Head Brightness Minimum) est l'intensité lumineuse minimale avec laquelle doit briller la tête du spz pour être détectée par le logiciel d'analyse d'image. C'est le contraste de la tête du spz par rapport au fond de l'image. La valeur recommandée par le fabricant étant de 187 pour la détection du spz canin et 180 pour le spz bovin et équin. Récemment, la valeur de 168 a été recommandée pour le spz bovin congelé par O'meara et ses collaborateurs (O'meara *et al.*, 2021).

La taille minimale de la tête du spz (AREA) encore appelée aire ou surface et exprimée en μm^2 , est égale au produit des deux axes (petit et grand) de la tête multipliée par 3.14 (π). Elle définit le seuil de détection par le logiciel d'analyse d'image et sa valeur recommandée par le fabricant est de $16\mu\text{m}^2$.

Effet des paramètres de détection cellulaire

Comme prévu plus haut dans l'hypothèse de notre étude, les paramètres de détection cellulaire étudiés dans le présent travail ont eu un effet très hautement significatif ($p=0.001$) sur les taux de normozoospermie, térazoospermie et sur notamment les anomalies morphologiques majeures à savoir la gouttelette proximale (PD) et le flagelle enroulé (CT).

Effet de la brillance

Pour l'effet de la brillance minimale (HBM), le taux de normozoospermie obtenu le plus proche de la microscopie (considérée dans notre étude comme étant la référence) correspond à la valeur de 140 (HBM) avec un taux de $85,91 \pm 2,14$ versus $92,42 \pm 0,97$. Cette valeur de brillance minimale représenterait l'optimum de contraste permettant une analyse optimale de la morphologie par le système HT-IVOS II. Tout écart de part et d'autre de cet optimum correspond à un taux de normozoospermie ou térazoospermie éloigné de la référence (Voir figures 38-39 et tableaux 6-7).

Il est à noter que la valeur recommandée par le fabricant (IMV-Technologies) qui est celle de 187 pour la brillance (HBM) correspond dans cette étude à un taux de normozoospermie de $66,27 \pm 2,74$ qui s'écarte considérablement du taux de référence à savoir $92,42 \pm 0,97$. Ceci signifie que ce paramétrage est inadapté. Ce constat pourrait s'expliquer éventuellement par l'effet direct de la brillance minimale sur la capacité du logiciel de morphométrie « IVOS II » à évaluer avec exactitude et précision la

morphologie des spz canins, car l'augmentation de la brillance minimale (HBM) implique une faible illumination et un faible contraste du spz par rapport au fond de l'image. Par ailleurs, ce constat pourrait s'expliquer également par un effet indirect de la brillance consécutif à une mauvaise détection des spz qui implique des erreurs de proportions dans la morphométrie.

Effet sur la typologie et les taux des anomalies

Concernant l'effet de la Brillance minimale sur le taux de la tératozoospermie, il reflète inversement celui de la normozoospermie, avec un optimum par rapport à la technique de référence correspondant à la valeur de 140 (HBM). De part et d'autre de cet optimum, une brillance minimale trop basse (HBM =100) « illumination trop élevée » ou trop haute (HBM=180-200) « illumination trop faible » surestime le taux de tératozoospermie. En effet, la brillance minimale trop basse surestime le taux de gouttelette proximale (PD) et la brillance trop élevée surestime le taux de flagelle enroulé (CT) par rapport à la référence avec respectivement $22,61 \pm 3,48\%$ versus $3,45 \pm 1,93\%$ et $19,99 \pm 3,53\%$ versus $4,45 \pm 0,85\%$.

Pour ces deux anomalies majeures, l'optimum de brillance se situe entre 140 et 160 respectivement pour la gouttelette proximale ($1,77 \pm 0,52$ versus $3,45 \pm 1,93$) et le flagelle enroulé ($5,51 \pm 0,77$ versus $4,45 \pm 0,85\%$) alors que la valeur de 140 de brillance correspond au taux de flagelle enroulé de $2,66 \pm 0,50$ versus $4,45 \pm 0,85\%$.

La gouttelette proximale est une masse cytoplasmique résiduelle de forme sphérique et régulière, localisée sous la membrane à proximité de la tête et du col du spz. A l'échelle ultra structurale, elle consiste en plusieurs vésicules, tubules et vacuoles qui dérivent de la dégénérescence de l'appareil de golgi, du réticulum endoplasmique et des résidus de la membrane nucléaire issus du spermatide précurseur (Oettle, 1993). Cette anomalie est associée à une baisse considérable du pouvoir fertilisant du spermatozoïde porteur et par conséquent une baisse de la fertilité in vivo. Au fait, elle interfère avec la capacitation du spz et donc avec sa fixation à la zone pellucide. Un taux élevé et permanent de cette anomalie est considéré comme un indicateur fiable de troubles de spermatogénèse chez le mâle reproducteur au sein des centres d'insémination artificielle bovine, équine et canine (Pena *et al.*, 2007). Il est donc indispensable que le système HT-IVOS II puisse détecter avec précision et exactitude cette anomalie majeure à impact sur la fertilité, notamment dans le cadre du contrôle de qualité.

Notre observation concernant la surestimation de la gouttelette proximale par le système HT-IVOS II concorde avec ce qui a été rapporté par O'meara et ses collaborateurs sur le spz bovin (O'meara *et al*, 2021) et pourrait s'expliquer par un effet artefactuel de la brillance ou du contraste. En effet, lors d'une forte illumination consécutive à la baisse du seuil de brillance à l'ordre de 100 (HBM), la structure normale du col (pièce connective) du spz pourrait s'illuminer et briller de manière exagérée et être détectée par le logiciel d'analyse d'image comme étant une gouttelette proximale. Une exploration ultra structurale pourrait expliquer les éventuelles causes d'augmentation de la brillance dans la région du col (pièce connective) induisant ces images artefactuelles.

Quant à l'anomalie du flagelle enroulé surestimé par une faible illumination, elle ne semble pas être concernée directement par le paramètre étudié « brillance minimale de la tête du spz » mais plutôt par un autre paramètre de détection qui n'est pas ciblé dans notre étude à savoir la brillance minimale du flagelle « TBM : Tail Brightness Minimum » (voir Annexe 02). Ainsi, l'explication de la surestimation de cette anomalie demeure tributaire d'une exploration plus poussée incluant l'étude d'autres paramètres de détection cellulaire, notamment la TBM.

Effet de la taille minimale de la tête du spz (AREA, μm^2)

Contrairement à la brillance, la taille minimale de la tête (AREA, μm^2) ne semble pas avoir un effet significatif ($p > 0.05$) sur les taux de normozoospermie et de térazozoospermie entre les valeurs de 2-12 μm^2 avec des valeurs similaires de normozoospermie entre 89,28 \pm 1,35 et 90,35 \pm 1.47% comparées à la valeur de référence de 92,42 \pm 0.97%. Par contre les valeurs de 14 et 16 μm^2 s'éloignent vers le bas de la valeur de référence de façon très hautement significative ($p=0,000$) avec des taux de normozoospermie sous-estimées de 74,35 \pm 2,37 et 66,27 \pm 2,74% respectivement.

La même il est à noter que la valeur recommandée par le fabricant (16 μm^2) s'écarte de la référence de l'ordre de 28,23% pour le taux de térazozoospermie ce qui est un écart important en matière d'évaluation de la morphologie. Ce taux de térazozoospermie faussement élevée est représenté surtout par le flagelle enroulé (CT) qui atteint les taux de 11,49 \pm 1,31% et 16,79 \pm 2,11% respectivement pour les tailles de

14 et 16 μm^2 à comparer à la référence (4,45%) alors que les taux de gouttelette proximale restent tous en dessous de la valeur de référence et ce pour toutes valeurs de AREA. Ceci s'explique par l'effet inverse de la brillance mentionné plus haut. En effet une faible illumination consécutive à un seuil élevé de brillance (HBM= 187) induit une sous-estimation de la gouttelette proximale. Même une taille minimale réglée à 16 μm^2 n'a pas permis d'obtenir la moitié du taux de référence de la gouttelette proximale (4,45%) dans ces conditions de faible illumination. Ceci montre l'intérêt d'un bon paramétrage de la brillance pour une morphométrie automatique sans coloration réalisée par le système HT-IVOS II.

Pour l'effet de la taille minimale du spz canin, (AREA) à des valeurs de brillance minimale (HBM) de 140 et 120, les résultats (Voir Annexe n° 02) n'ont montré aucune différence significative ($p>0.05$; Voir Annexe n° 03) pour les taux de normozoospermie, térazozoospermie, gouttelette proximale et flagelle enroulé. Ceci confirme encore une fois que le paramètre AREA n'affecte pas significativement la morphométrie dans les conditions de la présente étude. Il faut souligner ici qu'à ces valeurs de brillance, même une taille minimale de 16 μm^2 ne provoque pas une surestimation exagérée des taux de normozoospermie par rapport à la technique de référence (85,91 \pm 2,14 versus 92,42 \pm 0.97%).

Etude de corrélation entre IVOS II et microscopie classique

Bien que l'étude de corrélation n'a pas montré beaucoup des coefficients élevés, elle a permis de mettre en évidence une corrélation négative entre la microscopie classique et l'HT-IVOS II avec le paramétrage recommandé par le fabricant en l'occurrence une brillance minimale de la tête du spz de 187 et une taille minimale de 16 μm^2 avec un coefficient de -347 et -354 pour respectivement les taux de normozoospermie et du Flagelle Enroulé. L'ajustement du paramétrage de détection cellulaire à une brillance minimale de 140 et une taille minimale de 4 μm^2 a permis d'inverser le sens de cette corrélation en la rendant positive avec respectivement +0.391 et +0.332 (Voir figures n° 45-46). Cependant, d'autres explorations et l'optimisation d'autres paramétrages semblent nécessaires pour une meilleure adaptation de cette technique de morphométrie automatique par le système HT-IVOS II.

Par ailleurs, la faible corrélation avec la microscopie pourrait être due d'un côté à un manque d'optimisation du paramétrage, mais de l'autre à un manque de standardisation de la technique d'observation microscopique classique qui peut représenter un biais dans notre étude. L'idéal aurait été d'effectuer deux observations par deux personnes expérimentées, et si plus de 10% d'écart est enregistré entre les résultats, une troisième lecture s'impose pour trancher (Schubert et al., 2019).

Effet de l'immobilisation des spz sur la concentration et la morphométrie

L'immobilisation des spermatozoïdes avant ajustement a permis d'obtenir une valeur de concentration plus proche de la référence (284,2 versus 286,45) sur le nombre global des analyses effectuées (n=1120) avec une corrélation significative de 0.879. Ceci représente un effet de compensation des différents paramétrages du système IVOS II compris dans ces 1120 analyses CASA. Pour mieux comprendre ce chiffre, il faut effectuer une étude de corrélation entre les différents paramétrages de l'IVOS. Ainsi, le tableau n° 14 et 15 nous montrent que l'immobilisation des spermatozoïdes n'a pas permis d'améliorer la concentration spermatique très sous-estimée par le paramétrage recommandé par le fabricant (HBM 187 et AREA 16) du système HT-IVOS II par rapport à la technique de référence à savoir 19,76 (MOB) et 23,20 (STAT) versus 286,45 millions par ml. Même la corrélation n'a pas été améliorée avec des coefficients de 0.792 versus 0.743 respectivement pour les spz mobiles et statiques dans cette même catégorie ou paramétrage. Ceci confirme que ce paramétrage inadapté ne peut être compensé par une immobilisation des spz avant analyse, une mesure proposée avant par Iguer-Ouada en 2001 (Iguer-Ouada, 2001). Cette immobilisation des spermatozoïdes semble n'avoir pas affecté la forte corrélation existant entre l'IVOS II avec paramètre ajusté et la technique de référence avec des coefficients de 0.929 et 0.920 respectivement pour les spz mobiles et statiques dans cette catégorie (Voir Tableau n° 14). Cependant, si la corrélation n'est pas changée, la valeur de la concentration, elle s'élève de 292,54 à 399,03 millions spz/ml. Cette surestimation de la concentration consécutive à l'immobilisation des spermatozoïdes avant analyse pourrait s'expliquer par le fait que le paramétrage proposé dans notre étude comme ajustement est adapté à la situation de spz en mouvement et non pas statiques.

Concernant la morphométrie, l'immobilisation des spermatozoïdes semble être associée à une légère sous-estimation du taux de normozoospermie avec des taux de 64,71 versus 58,68% pour le paramétrage HBM187-AREA16 ; 87,45 versus 76,15% pour le paramétrage optimal dans notre étude (HBM140-AREA4) par rapport à une valeur de référence de 92,42%. Par contre, une légère amélioration de la corrélation avec la technique microscopique a été enregistrée après immobilisation des spermatozoïdes pour les deux paramétrages avec respectivement -0.251 versus 0.237 et 0.230 versus 0.542 avant et après immobilisation.

A terme de ce travail, il est à retenir que le paramétrage de détection cellulaire qui semble être le plus adapté est une brillance minimale (HBM) de 140 et une taille minimale (AREA) de la tête du spz canin entre 4-10 μm^2 . Ceci concorde parfaitement avec les résultats d'une étude conduite dans notre laboratoire (données non montrées) sur l'ajustement du paramétrage de détection cellulaire (HBM et AREA) pour la mesure de concentration et l'analyse de mobilité au moyen du système HT-IVOS II.

Cependant, la faible corrélation avec la microscopie classique mérite d'être explorée avec d'autres optimisations du paramétrage mais également une standardisation de l'observation microscopique classique.

Enfin, il faut souligner la nécessité que les fabricants des systèmes CASA doivent s'assurer parfaitement de la validation des paramétrages chargés sur leurs systèmes afin de prévenir des ajustements aléatoires par les utilisateurs conduisant à une grande variabilité intra et inter-laboratoires dans les résultats de la morphométrie automatique.

CONCLUSION

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

- Le paramétrage de détection cellulaire du système HT-IVOS II recommandé par le fabricant (IMV-Technologies : HBM 187 et AREA $16\mu\text{m}^2$) semble être tout à fait inadapté à l'analyse de la morphologie des spermatozoïdes canins par la morphométrie automatique du système.
- L'ajustement de la brillance minimale (HBM) à 140 et la taille minimale (AREA) de la tête du spz canin entre $4\text{-}10\mu\text{m}^2$ semble représenter le paramétrage de détection cellulaire le mieux adapté à l'analyse morphométrique automatique et sans coloration par le système HT-IVOS II.
- La morphométrie automatique réalisée au même temps que l'analyse de la mobilité au moyen du système HT-IVOS II, une lame d'analyse Leja© de $20\mu\text{m}$ et le paramétrage de détection cellulaire ajusté (HBM 140 et AREA $4\text{-}10\mu\text{m}^2$), représente une alternative acceptable à la technique classique (observation microscopique) offrant l'avantage de la rapidité et l'automatisation sans recours aux étapes de préparation, fixation et coloration de l'échantillon.
- Un mauvais paramétrage de la brillance minimale de la tête du spermatozoïde (HBM) pourrait induire des artefacts de contraste conduisant notamment à une surestimation de l'anomalie majeure de gouttelette cytoplasmique proximale.
- L'immobilisation des spermatozoïdes avant analyse par le système HT-IVOS II ne semble pas améliorer les résultats mais plutôt surestimer la concentration et sous-estimer la morphologie. Le paramétrage ajusté dans cette étude semble être adapté à la situation des spermatozoïdes en mouvement.

RECOMMANDATIONS

Enfin, au terme de ce travail nous aimerions recommander ce qui suit :

- Affiner la présente étude en améliorant la standardisation de l'analyse classique de la morphologie au microscope optique (technique classique), en utilisant deux lectures et une troisième en cas d'écart de plus d 10%.
- Valider l'ajustement du paramétrage du système HT-IVOS II recommandé dans cette étude par des explorations sur de larges effectifs et les standardiser par des comparaisons entre divers centres d'insémination artificielle canine.
- Affiner l'ajustement du paramétrage du système HT-IVOS II recommandé en étudiant à l'avenir d'autres paramètres de détection cellulaire telle que l'élongation de la tête du spz et leurs éventuels effets sur la morphométrie automatique.
- Adapter l'ajustement du paramétrage du système HT-IVOS II recommandé dans cette étude à d'autres situation comme par exemple les spermatozoïdes canins congelée-décongelés et la semence diluée dans des milieux contenant du JO ou du lait comme source de phospholipides pour la stabilisation membranaire.
- Extrapoler les résultats de cette étude sur d'autres espèces animales en travaillant sur la semence fraîche et congelée-décongelée des taureaux reproducteurs et des étalons (chevaux) d'insémination artificielle.
- Initier une étude et optimisation d'autres paramètres de détection cellulaire telle que la brillance minimale du flagelle « Tail Minimum Brightness » et ses effets sur la détection des anomalies du flagelle (Coiled et Bent tail).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ALVAREZ,C.,CASTILLA,J.A.,RAMIREZ,J.P.,VERGARA,F.,YOLDI,A.,FERNANDEZ,A., GAFORIO, J.J.,2005.External quality control program for semen analysis : Spanish experience. *J.Assist.Reprod.Genet.*22, 379–387

AMANN, RUPERT P. ET WABERSKI, DAGMAR. Computer-assisted sperm analysis (CASA): capabilities and potential developments. *Theriogenology*, 2014, vol. 81, no 1, p. 5-17. e3.

ANNE-SOPHIE BRIFFAUT(2007).CONGELATION DE LA SEMENCE CANINE. Détermination de la combinaison optimale de quatre facteurs différents. THESE Présentée à l'UNIVERSITE CLAUDE-BERNARD - LYON I. page 40 .41.

BORYSHPOLETS S, KOWALSKI RK, DIETRICH GJ, DZYUBA B, CIERESZKO A. Different computer-assisted sperm analysis (CASA) systems highly influence sperm motility parameters. *Theriogenology*. 15 oct 2013; 80(7) : 758-65.

BALL PJH, PETERS AR, PETERS AR. (2004).Reproduction in cattle.3rd edition.Oxford, UK; Ames, Iowa: Blackwell Pub; 242 p.

BARONE R. (1978).Anatomie comparée des mammifères domestiques.Tome 3. Splanchnologie .Fascicule 2. Appareil uro-génital, foetus et ses annexes, péritoine et topographie abdominale. Première édition. Vigot, Paris, 951 pp

BARONE R. Anatomie comparée des mammifères domestiques : appareil uro-génital, foetus et ses annexes, péritoine et topographie abdominale. Paris, France : Ed. Vigot ; **2001**

BARTH, A.D., BOWMAN, P.A., BO, G.A., MAPLETOFT, R.J., 1992.Effect of narrow sperm head shape on fertility in cattle.*Can. Vet.J.*33, 31–39.

BIELSA MA, ANDOLZ P, GRTIS JM.Which semen parameters have a predictive value for pregnancy in infertile couples. *Hum Reprod* 1994; 9: 1887-1 890.

BLANCH E,TOMASC,MOCE ML, VIUDES DE CASTRO MP,VICENTE JS,MOCE E,2008:effect of CLC and two diluents on boar sperm cryosurvival.In:Gomez E (ed.),joint international Meeting of AERA-BAS,GIJon,Spain.*ReprodDomestAnim* 43,71-72 (abstract p59)

BOATMAN DE, BAVISTER BD. Stimulation of rhesus monkey sperm capacitation by cyclic nucleotide mediators. *J ReprodFertil***1984**; 71:357-366.

- BROKAW, C. J. (1991).** Calcium sensors in sea urchin sperm flagella. *Cell Motil. Cytoskeleton* 18, 123–130. doi:10.1002/CM.970180207
- CHANDLER, J.E., PAINTER, C.L., ADKISON, R.W., MEMON, M.A., HOYT, P.G., 1988.** Semen quality characteristics of dairy goats. *J. Dairy Sci.* 71, 638–1646
- COETZEE K, BERMES N, KRAUSE W, MENKVELD R.** Comparison of normal sperm morphology outcomes from two different computer-assisted semen analysis systems. *Andrologia* 2001;33:159-163.
- COLLIN B. (2003).** Anatomie du chien. Edition Derouaux Ordina, Liège, 562 pp
- COMHAIRE FH, HUYSSSE S, HINTING A, VERMEULEN L, SCHOONJANS F.** Objective semen analysis: Has the target been reached? *Hum Reprod* 1992;7:237-241.
- COOPER, T.G., BJORND AHL, L., VREEBURG, J., NIESCHLAG, E., 2002.** Semen analysis and external quality control schemes for semen analysis need global standardization. *Int. J. Androl.* 25, 306–311
- DADOUNEA 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.
- DEANANDI J. LODHI,** “Structural and functional roles of ether lipids,” *Protein & cell*, pp. 196–206, 2018.
- DENISSENKO, V. KANTSLER, D. J. SMITH, AND J. KIRKMAN-BROWN,** “Human sperm-matzoa migration in microchannels reveals boundary-following navigation,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 109, no. 21, pp. 8007–8010, 2012.
- DOUGLAS-HAMILTON DH, SMITH NG, KUSTER CE, VERMEIDEN JPW, ALTHOUSE GC.** Particle distribution in low-volume capillary-loaded chambers. *J Androl* 2005;26:107–14.
- Dumon and A. Fontbonne,** “Les indispensables de l’animal de compagnie re-production,” 1992.
- FELDMAN E.C., NELSON R.W. (1987).** Disorders of the canine male reproductive tract. In : *Canine and feline endocrinology and reproduction.* W.B. Saunders company, Philadelphia, 481- 524.

FINO, M.G., CAGLIERESI, C., CRISCUOLI, L., GANDINI, L., BIGGERI, A., MAGGI, M., BALDI, E. (2013). High variability in results of semen analysis in andrology laboratories in Tuscany (Italy): the experience of an external quality control (EQC) programme. *Andrology-US1*, 401–407

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, 251-260p.

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.

FONTBONNE A. (1992). Physiologie sexuelle du chien mâle. In : Pages J.P. (eds.). *Les indispensables de l'animal de compagnie. Reproduction du chien et du chat.* PMCAC Edition, Paris, 19-26.

FRASER L. Ca²⁺ is required for mouse sperm capacitation and fertilization in vitro. *J. ANDROL.* , 1982, 3, 412-419.

FRASER L.R., HEROD J.E. Expression of capacitation-dependent changes in chlortetracycline fluorescence patterns in mouse spermatozoa requires a suitable glycosable substrate. *J. Reprod. Fertil.*, 1990, 88, 611-621.

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

GAGO C, PEREZ SANCHEZ F, YEUNG C, TABLADO L, COOPER T, ET AL. Standardization of sampling and staining methods for the morphometric evaluation of sperm heads in the cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) using computer assisted image analysis. *Int J Androl* 1998; 21: 169–76

GATIMEL, N., MOREAU, J., PARINAUD, J., & LEANDRI, R. D. (2017). Sperm morphology: Assessment, pathophysiology, clinical relevance, and state of the art in 2017. *Andrology*, 5, 845–862. <https://doi.org/10.1111/andr.12389>

- GEUSSOVA G., PEKNICOVA J., CAPKOVA J., KALAD P., MOOS Jj, PHILIMONENKO V.V., HOZAK P.** Monoclonal antibodies to canine intra-acrosomal sperm proteins recognizing acrosomal status during capacitation and acrosome reaction. *Andrologia*, **1997**, 29, 261-268.
- GILLAN L., EVANS G., MAXWELL W.M.C.** Capacitation status and fertility of fresh and frozen-thawed ram spermatozoa. *Reprod. Fertil. Dev.*, **1997**, 9, 481-487
- GUERIN P., FONTBONNE A., BUFF S., MENEZO Y.** La gouttelette cytoplasmique résiduelle du spermatozoïde. *Andrologie*, **1999**, 9, 380-386.
- GUNALP, S., ONCULOGLU, C., GURGAN, T., KRUGER, T.F. AND LOMBARD, C.J., 2001.** A study of semen parameters with emphasis on sperm morphology in a fertile population: an attempt to develop clinical thresholds. *Human reproduction*, 16(1), 110-114.
- HIDALGO, M., RODRIGUEZ, I., DORADO, J., 2006.** Influence of staining and sampling procedures on goat sperm morphometry using the Sperm Class Analyzer. *Theriogenology* 66, 996–1003.
- HOLT, H.D. MOORE, AND S.G. HILLIER,** “Computer-assisted measurement of sperm swimming speed in human semen : correlation of results with in vitro fertilization assays,” *Fertility and sterility*, vol. 44, no. 1, pp. 112–119, **1985**.
- IGUER-OUADA M, VERSTEGEN J.** Evaluation of the Hamilton Thorn Computer Based automated system for dog semen analysis *Theriogenology* **2001**;55:733-749.
- JASKO DJ, LEIN DH, FOOTE RH.** The relationship between sperm morphological classification and fertility in the stallion. *J Am Vet Med Assoc* **1990**;197:389–94.
- JOHNSTON S., M. R. KUSTRITZ,** and P. Olson, “Semen collection, evaluation and preservation,” *Canine and feline theriogenology*, pp. 287–306, **2001a**.
- JOHNSTON, M. R. KUSTRITZ, AND P. OLSON,** “Sexual differentiation and normal anatomy of the dog,” *Canine and feline theriogenology*, pp. 275–286, **2001b**.
- KATZ D. F. AND J. W. OVERSTREET,** “Sperm motility assessment by videomicrography,” *Fertility and sterility*, vol. 35, no. 2, pp. 188–193, **1981**.
- KNOBIL E. AND J. D. NEILL,** “Encyclopedia of reproduction,” **1998**.

KRUGET.F.,T.C.DUTOIT,D.R.FRANKEN,A.A.ACOSTA,S.C.OEHNINGE R,R.MENKVELD,ANDC.J.LOMBARD,“Anewcomputerizedmethodofreading sperm morphology (strict criteria) is as efficient as technician reading,” *Fertility and sterility*, vol.59,no.1,pp.202–209,**1993**.

KRUGER T. AND K. COETZEE, “The role of sperm morphology in assisted reproduction,” *Human reproduction update*, vol.5,no.2,pp.172–178,**1999**

KUTZLER M. A., “Semen collection in the dog,” *Theriogenology*, vol. 64, pp. 747–754,**2005**.

LINDE-FORSBERG C. (1995)., Artificial insemination with fresh, chilled extended, and frozen-thawed semen in the dog. *Seminars in Veterinary Medicine and Surgery* , 10, 485-8p

LU J.,Y.HUANG,ANDN.LU,“Computer-aided sperm analysis: past, present and future,” *Andrologia*, pp.329, 338,**2014**.

MACHIN K., “Wave propagation along flagella,” *Journal of Experimental Biology*, vol.35,no.4,pp.796–806,**1958**.

MACLEOD, J. AND GOLD, R.Z., 1951. The male factor in fertility and infertility: IV. Sperm morphology in fertile and infertile marriage. *Fertility and sterility*, 2(5), 394-414.

MAO J, WUGM, PRATHER RS, SMITH MF, CANTLEY T, RIEKE A, DIDION BA, DAY BN, 2005 : effect of methyl beta cyclodextrin treatment of pig spermatozoa on in vitro fertilization and embryo development in the absence or presence of caffeine *Theriogenology* 64,1913-**1927**.

MAREE L. DU PLESSIS S.,MENKVELD R, AND G. VAN DER HORST, “Morphometric dimensions of the human sperm head depend on the staining method used,” *Human Reproduction*, vol.25,no.6,pp.1369–1382,**2010**.

MIALOT J.-P., *Pathologie de la reproduction chez les carnivores domestiques*. Ed. du point vét,**1984**

MIKIK.ANDCLAPHAM

D.E.,“Rheotaxis guides mammalian sperm,” *Current Biology*, vol.23,no.6,pp.443–452,**2013**.

C.F.MILLETTE,“Spermatozoa.in,knoble.,neillj.d.(eds).” *Encyclopedia of reproduction*, p.586–596,**1998**.

- MORTIMER AND D. MORTIMER**, “Kinematics of human spermatozoa incubated under capacitating conditions,” *Journal of andrology*, pp.195–203, **1990**.
- MORTIMER S. T., VAN DER HORST G., AND MORTIMER D.**, “The future of computer-aided sperm analysis,” *Asian journal of andrology*, vol.17, **2015**.
- NEUWINGER, J., BEHRE, H. M., AND NIESCHLAG, E. (1990)**. External quality control in the andrology laboratory: an experimental multicenter trial. *Fertil. Steril.* 54, 308–314. doi:10.1016/S0015-0282(16)53709-1
- OETTLE E.**, “Sperm morphology and fertility in the dog.” *Journal of reproduction and fertility. Supplement*, pp.257–260, **1993**.
- OMBELET W. MENKVELD R., KRUGER T., AND STEENO O.**, “Sperm morphology as assessment: historical review in relation to fertility” *Human Reproduction Update*, vol.1, no.6, pp.543–557, **1995**.
- OTT R.S., GOFFAUX M., THIBIER M. (1987)**. Examen morphologique des spermatozoïdes. *El. et Ins.*, 221, 15-20.
- PENA AI, BARRIO M, BECERRA JJ, QUINTELA LA, HERRADON PG. (2007)**. Infertility in a Dog due to Proximal Cytoplasmic Droplets in the ejaculate : Investigation of the Significance of Sperm Functionality In Vitro. *Reprod. Dom. Anim.*, 42, 471-478.
- PONTHIER, J., BERGHE, F.V.D., PARRILLA-HERNANDEZ, S., HANZEN, C., DELEUZE, S., 2014**. Congélation du sperme dans l’espèce équine : état des lieux et perspectives. *ANN MÉD VÉT* 158, p.57-72.
- PRINS G.S. (1998)**. In : Knobil E., Neill J.D. (eds.) *Encyclopedia of reproduction*. Volume 4. Academic press, San Diego, 360-367p.
- PUNJABI U., WYNSC., MAHMOUD, A. VERNELEN K., CHINA B., AND G. VERHEYEN**, “Fifteen years of Belgian experience with external quality assessment of semen analysis,” *Andrology*, vol.4, no.6, pp.1084–1093, **2016**.
- REECE W.O. (1997)**. Male reproduction. In : Reece W.O. (eds.). *Physiology of domestic animals*. Second edition. Williams and Wilkins Company, Baltimore, 344-365.
- SAGOT Cécile (2019)**. Cryoconservation de la semence canine : étude de l’influence des conditions de décongélation sur la mobilité des spermatozoïdes ; thèse Présentée à l’université Claude-Bernard - Lyon 1 Page 49.

SAACKE RG. Sperm morphology ; its relevance to compensable and uncompensable traits in semen. *Theriogenology*.2008; 70(3).473
8.<http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.200804.012>.PMID.18495234.

SIMON, L. AND LEWIS, S.E., 2011. Sperm DNA damage or progressive motility: which one is the better predictor of fertilization in vitro?.*Systems biology in reproductive medicine*, 57(3), 133-138.

TALARCZYK-DESOLE, J., BERGER, A., TASZAREK-HAUKE, G., HAUKE, J., PAWELCZYK, L. AND JEDRZEJCZAK, P., 2017. Manual vs. computer-assisted sperm analysis: can CASA replace manual assessment of human semen in clinical practice?.*Ginekologia Polska*, 88(2), 56-60.

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.

VAN DER HORST, G. AND DU 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.

WIJCHMAN JG, DE WOLF BTHM, JAGER S (1995) Evaluation of a computer-aided semen analysis system with sperm tail detection. *Hum Reprod* 10:2090-2095.

YANIZ JL, SOLER C, SANTOLARIA P. Computer assisted sperm morphometry in mammals: a review. *AnimReprodSci*2015; 156: 1–12

ZINAMAN MJ, UHLER ML, VERTUNO E, FISHER SG, CLEGG ED (1996)
Evaluation of computer-assisted semen analysis (CASA) with IDENT stain to determine sperm concentration. *J Androl* 17:288-292.

ANNEXES

Annexe 01 :

Les défirent photos de la partie expérimentale



Figure N° 17 : Photo de chien inclus dans la partie expérimentale



Figure N° 23: Matériel de récolte de semence canine et Bain marie à 37°C



Figure N° 19: Photomètre calibré de marque SDM1 MINITUB



Figure N° 24: Microscope optique de marque NIKON E100 à platine chauffante



Figure N° 25: Lame d'analyse LEJA ® à 4chambres de 20µm.

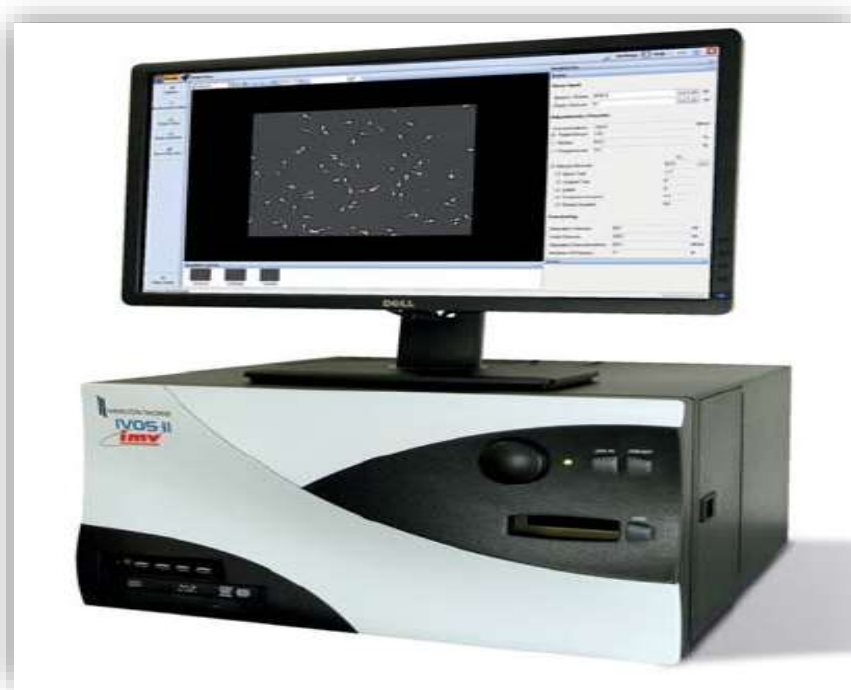


Figure N° 22 : Analyseur HAMILTHON THORNE IVOSII



Figure N° 26: Présentation du microscope et camera intégrée de L'analyseur Hamilton-Thorne IVOS II



Figure N° 27: Microscope optique de marque OPTIKA



Figure N° 28: Matérielles de montage



Figure N° 29: Défèrent matérielles utilisé pour l'analyse de la semence



Figure N° 30: la récolte de sperme chez le chien



Figure N° 31: Les trois différentes fractions spermatiques recueillies chez le chien
(Pré spermatique, spermatique, post-spermatique)



Figure N° 32: Dépôt d'une goutte de semence sur une lame pour évaluation



Figure N° 33: Le photomètre SDM1, Mini tub.



Figure N° 34 : Easy buffer (solution commerciale)



Figure N° 35:identification de la lame



Figure N° 36: agitation de l'échantillon

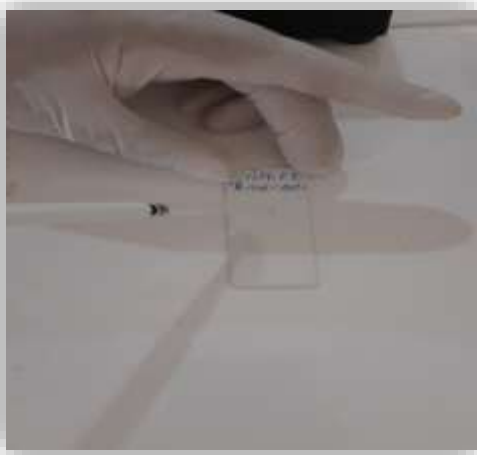


Figure N° 37: dépose la goutte sur la lame **Figure N° 35:** étalement de la goutte sur la surface de la lame



Figure N° 36: les différentes solutions Diff-Quik

Annexe 02 :

Paramétrage de détection cellulaire de l'HT-IVOS II recommandé par IMV-Technologies.

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

Annexe 03 :

Statistiques descriptives des taux de normozoospermie (NORM), térazozoospermie (ANORM), Gouttelette Proximale (PD) et Flagelle enroulé (CT), pour toutes les valeurs d'AREA (2-16 μ m²) et HBM 120 et 140.

Rapport									
AREA		NORM. 140	NORM. 120	ANOR. 140	ANOR. 120	PD. 140	PD 120	CT 140	CT 120
2	Moyenne	85,4150	79,8800	15,3800	21,1350	1,1150	4,3550	1,8700	2,0900
	N	20	20	20	20	20	20	20	20
	ESM	1,94505	1,76387	2,15382	1,80427	,35845	,75144	,32274	,30727
	Minimum	71,40	63,60	1,80	3,40	,00	,10	,00	,10
	Maximum	98,10	96,60	32,00	32,60	7,20	13,50	5,10	4,20
4	Moyenne	83,6500	77,0400	17,3700	24,2800	1,3250	4,7950	2,0700	2,4050
	N	20	20	20	20	20	20	20	20
	ESM	2,54271	2,24677	2,80472	2,61777	,42839	1,04455	,36405	,37138
	Minimum	63,70	62,40	1,10	3,40	,00	,00	,00	,20
	Maximum	98,90	96,60	38,40	48,20	8,60	20,40	5,70	5,40
6	Moyenne	83,5450	75,9350	17,5050	25,8750	1,4250	5,7750	2,1450	2,4650
	N	20	20	20	20	20	20	20	20
	ESM	2,61979	2,48619	2,90628	2,89262	,48935	1,11066	,37010	,39023
	Minimum	62,70	61,00	1,10	3,40	,00	,20	,00	,10
	Maximum	98,90	96,60	40,70	50,40	9,90	21,80	5,70	5,60
8	Moyenne	84,0450	76,5450	17,0400	26,5000	1,4800	6,2150	2,1700	2,5050
	N	20	20	20	20	20	20	20	20
	ESM	2,61259	2,55444	2,92516	3,08743	,51410	1,21891	,37269	,41151
	Minimum	63,60	59,10	1,10	3,50	,00	,20	,00	,20
	Maximum	98,90	96,50	41,70	53,30	10,40	23,80	5,40	6,00

10	Moyenne	84,8050	76,7000	16,1800	26,3900	1,5000	6,3500	2,1450	2,5200
	N	20	20	20	20	20	20	20	20
	ESM	2,42754	2,58587	2,74157	3,13694	,51545	1,25527	,37300	,41502
	Minimum	66,20	58,80	,90	3,60	,00	,20	,00	,20
	Maximum	99,10	96,50	41,80	54,00	10,40	24,60	5,60	6,10
12	Moyenne	85,6850	76,8900	15,3700	26,2950	1,5250	6,4700	2,1150	2,6000
	N	20	20	20	20	20	20	20	20
	ESM	2,25405	2,59556	2,60902	3,18183	,51925	1,29139	,36529	,43274
	Minimum	66,40	58,30	1,00	3,60	,00	,20	,00	,10
	Maximum	99,00	96,50	41,70	54,90	10,60	25,10	5,60	6,30
14	Moyenne	86,5150	77,5600	14,7000	23,7150	1,5450	6,4300	2,1850	2,5500
	N	20	20	20	20	20	20	20	20
	ESM	2,08776	2,55152	2,45677	3,22172	,51116	1,30404	,38466	,43502
	Minimum	67,00	58,10	1,20	2,70	,00	,20	,00	,00
	Maximum	98,80	97,30	41,00	55,20	10,50	25,50	6,00	6,30
16	Moyenne	85,9150	79,5300	15,4400	24,5150	1,7750	6,4050	2,6650	2,4694
	N	20	20	20	20	20	20	20	160
	ESM	2,13769	2,55219	2,50903	3,01909	,51676	1,27231	,50535	,13894
	Minimum	68,90	58,50	,00	3,60	,00	,20	,00	,00
	Maximum	100,00	96,40	39,10	54,90	10,30	25,60	8,30	6,30

Annexe 04 :

Effet de la variation d'AREA sur les taux de normozoospermie (NORM),
tératozoospermie (ANORM), Gouttelette Proximale (PD) et Flagelle enroulé (CT), à
deux valeurs deHBM (120 et 140).

Tableau ANOVA			
		F	Sig. (p)
NORM.AREA.HBM140.MOB * AREA	Entre groupes	,225	,979
	Intra-groupes		
	Total		
NORM.AREA.HBM120.MOB * AREA	Entre groupes	,347	,931
	Intra-groupes		
	Total		
ANOR.AREA.HBM140.MOB * AREA	Entre groupes	,161	,992
	Intra-groupes		
	Total		
ANOR.AREA.HBM120.MOB * AREA	Entre groupes	,402	,900
	Intra-groupes		
	Total		
PD.AREA.HBM.140.MOB * AREA	Entre groupes	,153	,993
	Intra-groupes		
	Total		
PD.AREA.HBM.120.MOB * AREA	Entre groupes	,498	,835
	Intra-groupes		
	Total		
CT.AREA.HBM140.MOB * AREA	Entre groupes	,336	,936
	Intra-groupes		
	Total		
CT.AREA.HBM120.MOB * AREA	Entre groupes	,177	,990
	Intra-groupes		
	Total		

Annexe 05 :

Corrélation de Pearson entre plusieurs paramétrages du HT-IVOS II (HBM187-Area16 ; HBM140-Area6 ; HBM140-Area4 ; HBM120-Area6 ; HBM120-Area4) et la microscopie (MIC) pour le paramètre de normozoospermie.

Corrélations

		NORM187.16	NORM140.6	NORM140.4	NORM.120.6	NORM120.4	MIC
NORM187.16	Corrélation de Pearson	1	-,062	-,074	,057	,119	-,347
	Sig. (bilatérale)		,794	,756	,813	,619	,134
	N	20	20	20	20	20	20
NORM140.6	Corrélation de Pearson	-,062	1	,998**	,909**	,856**	,391
	Sig. (bilatérale)	,794		,000	,000	,000	,088
	N	20	20	20	20	20	20
NORM140.4	Corrélation de Pearson	-,074	,998**	1	,903**	,851**	,393
	Sig. (bilatérale)	,756	,000		,000	,000	,086
	N	20	20	20	20	20	20
NORM.120.6	Corrélation de Pearson	,057	,909**	,903**	1	,988**	,308
	Sig. (bilatérale)	,813	,000	,000		,000	,186
	N	20	20	20	20	20	20
NORM120.4	Corrélation de Pearson	,119	,856**	,851**	,988**	1	,250
	Sig. (bilatérale)	,619	,000	,000	,000		,288
	N	20	20	20	20	20	20
MIC	Corrélation de Pearson	-,347	,391	,393	,308	,250	1
	Sig. (bilatérale)	,134	,088	,086	,186	,288	
	N	20	20	20	20	20	20

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

Annexe 06 :

Corrélation de Pearson entre plusieurs paramétrages du HT-IVOS II (HBM187-Area16 ; HBM140-Area6 ; HBM140-Area4 ; HBM120-Area6 ; HBM120-Area4) et la microscopie (MIC) pour la Gouttelette Proximale (PD).

Corrélations

		GP.MIC	GP.187.16	GP.140.4	GP.140.6	GP.120.4	GP.120.6
GP.MIC	Corrélation de Pearson	1	-,034	-,137	-,129	,062	,001
	Sig. (bilatérale)		,888	,565	,589	,795	,995
	N	20	20	20	20	20	20
GP.187.16	Corrélation de Pearson	-,034	1	,184	,181	,407	,327
	Sig. (bilatérale)	,888		,437	,446	,075	,159
	N	20	20	20	20	20	20
GP.140.4	Corrélation de Pearson	-,137	,184	1	,999**	,902**	,901**
	Sig. (bilatérale)	,565	,437		,000	,000	,000
	N	20	20	20	20	20	20
GP.140.6	Corrélation de Pearson	-,129	,181	,999**	1	,898**	,893**
	Sig. (bilatérale)	,589	,446	,000		,000	,000
	N	20	20	20	20	20	20
GP.120.4	Corrélation de Pearson	,062	,407	,902**	,898**	1	,916**
	Sig. (bilatérale)	,795	,075	,000	,000		,000
	N	20	20	20	20	20	20
GP.120.6	Corrélation de Pearson	,001	,327	,901**	,893**	,916**	1
	Sig. (bilatérale)	,995	,159	,000	,000	,000	
	N	20	20	20	20	20	20

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

Annexe 07 :

Corrélation de Pearson entre plusieurs paramétrages du HT-IVOS II (HBM187-Area16 ; HBM140-Area6 ; HBM140-Area4 ; HBM120-Area6 ; HBM120-Area4) et la microscopie (MIC) pour la Flagelle Enroulé (CT).

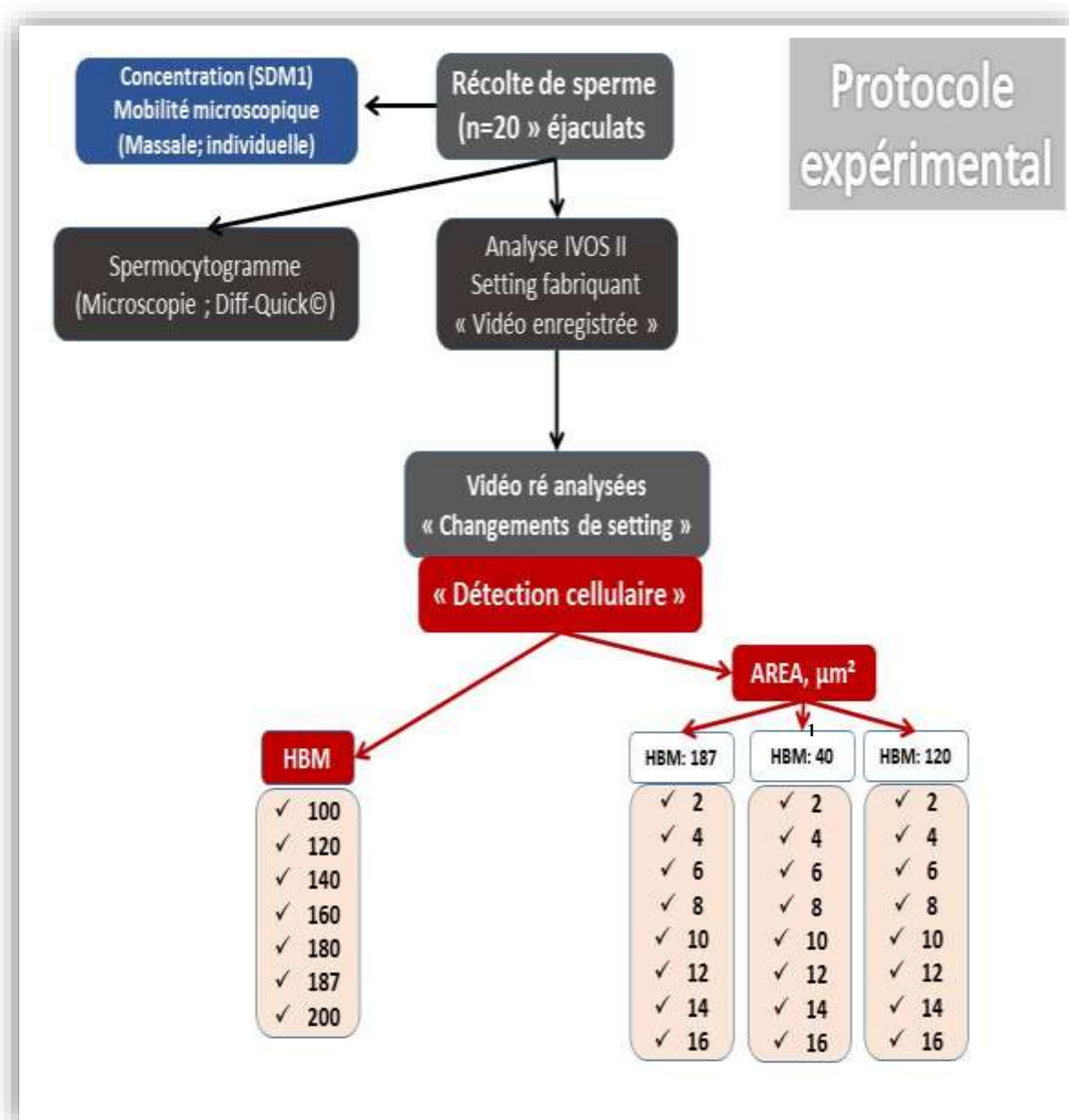
Corrélations

		FE.MIC	FE.187.16	FE.140.6	FE.140.4	FE.120.6	FE.120.4
FE.MIC	Corrélation de Pearson	1	-,354	,332	,331	,303	,291
	Sig. (bilatérale)		,125	,152	,154	,195	,213
	N	20	20	20	20	20	20
FE.187.16	Corrélation de Pearson	-,354	1	,182	,196	,095	,093
	Sig. (bilatérale)	,125		,442	,408	,690	,697
	N	20	20	20	20	20	20
FE.140.6	Corrélation de Pearson	,332	,182	1	,999**	,819**	,787**
	Sig. (bilatérale)	,152	,442		,000	,000	,000
	N	20	20	20	20	20	20
FE.140.4	Corrélation de Pearson	,331	,196	,999**	1	,821**	,788**
	Sig. (bilatérale)	,154	,408	,000		,000	,000
	N	20	20	20	20	20	20
FE.120.6	Corrélation de Pearson	,303	,095	,819**	,821**	1	,998**
	Sig. (bilatérale)	,195	,690	,000	,000		,000
	N	20	20	20	20	20	20
FE.120.4	Corrélation de Pearson	,291	,093	,787**	,788**	,998**	1
	Sig. (bilatérale)	,213	,697	,000	,000	,000	
	N	20	20	20	20	20	20

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

Annexe n° 08

Protocole expérimental



1. Alvarez,C.,Castilla,J.A.,Ramírez,J.P.,Vergara,F.,Yoldi,A.,Fernandez,A., Gaforio, J.J.,2005.External quality control program for semen analysis : Spanish experience. *J.Assist.Reprod.Genet.*22, 379–387
 2. AMANN, Rupert P. et WABERSKI, Dagmar. Computer-assisted sperm analysis (CASA): capabilities and potential developments. *Theriogenology*, 2014, vol. 81, no 1, p. 5-17. e3.
 3. Boryshpolets S, Kowalski RK, Dietrich GJ, Dzyuba B, Ciereszko A. Different computer-assisted sperm analysis (CASA) systems highly influence sperm motility parameters. *Theriogenology*. 15 oct 2013 ; 80(7) : 758-65.
 4. Ball PJH, Peters AR, Peters AR. (2004). *Reproduction in cattle*. 3rd edition. Oxford, UK ; Ames, Iowa : Blackwell Pub; 242 p.
 5. Barone R. (1978) .*Anatomie comparée des mammifères domestiques*.Tome 3. Splanchnologie .Fascicule 2. Appareil uro-génital, foetus et ses annexes, péritoine et topographie abdominale. Première édition. Vigot, Paris, 951 pp.
 6. Barone R. *Anatomie comparée des mammifères domestiques : appareil uro-génital, foetus et ses annexes, péritoine et topographie abdominale*. Paris, France : Ed. Vigot ; 2001.
 7. Barth, A.D.,Bowman,P.A.,Bo,G.A.,Mapletoft,R.J.,1992.Effectofnarrow sperm head shape on fertility in cattle.*Can.Vet.J.*33,31–39.
 8. Bielsa MA, Andolz P, Grtis JM. Which semen parameters have a predicitive value for pregnancy in infertile couples. *Hum Reprod* 1994; 9: 1887-1 890.
 9. Blanch E,TomasC,Mocé ML, viudes de castro MP,vicente JS,mocé E,2008 :effect of CLC and two diluents on boar sperm cryosurvival.In:Gomez E (ed.),joint international Meeting of AERA-BAS,GIJon,Spain.*Reprod domest Anim* 43,71-72 (abstract p59)
 - 10 Boatman DE, Bavister BD. Stimulation of rhesus monkey sperm capacitation by cyclic nucleotide mediators. *J Reprod Fertil* 1984;71:357-366.
 - 11 Brokaw, C. J. (1991). Calcium sensors in sea urchin sperm flagella. *Cell Motil. Cytoskeleton* 18, 123–130. doi:10.1002/CM.970180207
 - 12 Chandler, J.E.,Painter,C.L.,Adkison,R.W.,Memon,M.A.,Hoyt,P.G., 1988. Semen quality characteristics of dairy goats. *J.DairySci.*71, 638–1646
- Coetzee K, Bermes N, Krause W, Menkveld R. Comparison of normal sperm

- 13 morphology outcomes from two different computer-assisted semen analysis systems. *Andrologia* 2001;33:159-163.
- 14 Collin B. (2003) .Anatomie du chien. Edition Derouaux Ordina, Liège, 562 pp.
- 15 Comhaire FH, Huysse S, Hinting A, Vermeulen L, Schoonjans F. Objective semen analysis: Has the target been reached? *Hum Reprod* 1992;7:237-241.
- 16 Cooper, T.G.,Bjorndahl,L.,Vreeburg,J.,Nieschlag,E.,2002.Semenanalysis and external quality control schemes for semen analysis need global standardization. *Int.J.Androl.*25,306–311
- 17 DadouneA 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.
- 18 Dean and I. J. Lodhi, “Structural and functional roles of ether lipids,” *Protein & cell*, pp. 196–206, 2018.
- 19 Denissenko, V. Kantsler, D. J. Smith, and J. Kirkman-Brown, “Human sper- matozoa migration in microchannels reveals boundary-following navigation,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 109, no. 21, pp. 8007– 8010, 2012.
- 20 Douglas-Hamilton DH, Smith NG, Kuster CE, Vermeiden JPW, Althouse GC. Particle distribution in low-volume capillary-loaded chambers. *J Androl* 2005;26:107–14.
- 21 Dumon and A. Fontbonne, “Les indispensables de lanimal de compagne re- production,” 1992.
- 22 Feldman E.C., Nelson R.W. (1987) .Disorders of the canine male reproductive tract. In : *Canine and feline endocrinology and reproduction*. W.B. Saunders compagny, Philadelphia, 481- 524.
- 23 Filimberti, E.,Degl’Innocenti,S.,Borsotti,M.,Quercioli,M.,Piomboni,P., Natali, I.,Fino,M.G.,Caglieresi,C.,Criscuoli,L.,Gandini,L.,Biggeri,A., Maggi, M.,Baldi,E.,2013.High variability in results of semen analysis in andrology laboratories in Tuscany (Italy): the experience of an external quality control (EQC) programme. *Andrology-US*1,401–407
- 24 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, 251-260p.
- 25 Fontbonne A. (1995)., Infécondité du chien mâle. In : encyclopédie vétérinaire .Pathologie de la reproduction. Elvesier, Paris, Volume 5,1-13.
 - 26 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.
 - 27 Fontbonne A. (1992).Physiologie sexuelle du chien mâle. In : Pages J.P. (eds.). Les indispensables de l'animal de compagnie. Reproduction du chien et du chat. PMCAC Edition, Paris, 19-26.
 - 28 FRASER L. Ca²⁺ is required for mouse sperm capacitation and fertilization in vitro. J. Androl. , 1982, 3, 412-419.
 - 29 FRASER L.R., HEROD J.E. Expression of capacitation-dependent changes in chlortetracycline fluorescence patterns in mouse spermatozoa requires a suitable glycosable substrate. J. Reprod. Fertil., 1990, 88, 611-621.
 - 30 Freshman J.L. (2002).Semen collection and évaluation. Clin. Tech. Small Anim. Pract., 17, 3, 104-107.
 - 31 Gago C, Perez Sanchez F, Yeung C, Tablado L, Cooper T, et al. Standardization of sampling and staining methods for the morphometric evaluation of sperm heads in the cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) using computer assisted image analysis. Int J Androl 1998; 21: 169–76
 - 32 Gatimel, N., Moreau, J., Parinaud, J., & Léandri, R. D. (2017). Sperm morphology: Assessment, pathophysiology, clinical relevance, and state of the art in 2017. Andrology, 5, 845–862. <https://doi.org/10.1111/andr.12389>
 - 33 GEUSSOVA G., PEKNICOVA J., CAPKOVA J., KALAD P., MOOS Jj, PHILIMONENKO V.V., HOZAK P. Monoclonal antibodies to canine intra-acrosomal sperm proteins recognizing acrosomal status during capacitation and acrosome reaction. Andrologia, 1997, 29, 261-268.
 - 34 GILLAN L., EVANS G., MAXWELL W.M.C. Capacitation status and fertility of fresh and frozen-thawed ram spermatozoa. Reprod. Fertil. Dev., 1997, 9, 481-487.
 - 35 GUERIN P., FONTBONNE A., BUFF S., MENEZO Y. La gouttelette cytoplasmique résiduelle du spermatozoïde. Andrologie, 1999, 9, 380-386.
 - 36 Gunalp, S., Onculoglu, C., Gurgan, T., Kruger, T.F. and Lombard, C.J., 2001.

- A study of semen parameters with emphasis on sperm morphology in a fertile population: an attempt to develop clinical thresholds. *Human reproduction*, 16(1), 110-114.
- 37 Hidalgo, M.,Rodriguez,I.,Dorado,J.,2006.Influence of staining and sampling procedures on goat sperm morphometry using the Sperm Class Analyzer. *Theriogenology*66,996–1003.
- 38 Holt, H. D. Moore, and S. G. Hillier, “Computer-assisted measurement of sperm swimming speed in human semen : correlation of results with in vitro fertilization assays,” *Fertility and sterility*, vol. 44, no. 1, pp. 112–119, 1985.
- 39 Iguer-Ouada M, Verstegen J. Evaluation of the Hamilthon Thorn Computer Based automated system for dog semen analysis *Theriogenology* 2001;55:733-749.
- 40 Jasko DJ, Lein DH, Foote RH. The relationship between sperm morphological classification and fertility in the stallion. *J Am Vet Med Assoc* 1990;197:389–94.
- 41 S. Johnston, M. R. Kustritz, and P. Olson, “Semen collection, evaluation and preservation,” *Canine and feline theriogenology*, pp. 287–306, 2001a.
- 42 Johnston, M. R. Kustritz, and P. Olson, “Sexual differentiation and normal anatomy of the dog,” *Canine and feline theriogenology*, pp. 275–286, 2001b.
- 43 D. F. Katz and J. W. Overstreet, “Sperm motility assessment by videomicrogra- phy,” *Fertility and sterility*, vol. 35, no. 2, pp. 188–193, 1981.
- 44 E. Knobil and J. D. Neill, “*Encyclopedia of reproduction*,” 1998.
- 45 T. F. Kruger, T. C. DuToit, D. R. Franken, A. A. Acosta, S. C. Oehninger,R. Menkveld, and C. J. Lombard, “A new computerized method of reading spermmorphology (strict criteria) is as efficient as technician reading,” *Fertility and sterility*, vol. 59, no. 1, pp. 202–209, 1993.
- 46 T. Kruger and K. Coetzee, “The role of sperm morphology in

- assisted reproduction,” *Human reproduction update*, vol. 5, no. 2, pp. 172–178, 1999.
- 47 M. A. Kutzler, “Semen collection in the dog,” *Theriogenology*, vol. 64, pp. 747–754, 2005.
- 48 Linde-Forsberg C. (1995) ., Artificial insemination with fresh, chilled extended, and frozen-thawed semen in the dog. *Seminars in Veterinary Medicine and Surgery* , 10, 4858p
- 49 J. Lu, Y. Huang, and N. Lü, “Computer-aided sperm analysis : past, present and future,” *Andrologia*, pp. 329 ,338 , 2014.
- 50 K. Machin, “Wave propagation along flagella,” *Journal of Experimental Biology*, vol. 35, no. 4, pp. 796–806, 1958.
- 51 MacLeod, J. and Gold, R.Z., 1951. The male factor in fertility and infertility: IV. Sperm morphology in fertile and infertile marriage. *Fertility and sterility*, 2(5), 394-414.
- 52 Mao J, Wu GM, Prather RS, Smith MF, Cantley T, Rieke A, Didion BA, Day BN, 2005 :effect of methyl beta cyclodextrin treatment of pig spermatozoa on in vitro fertilization and embryo development in the absence or presence of caffeine *Theriogenology* 64,1913-1927.
- 53 L. Maree, S. Du Plessis, R. Menkveld, and G. Van der Horst, “Morphometric dimensions of the human sperm head depend on the staining method used,” *Human Reproduction*, vol. 25, no. 6, pp. 1369–1382, 2010.
- 54 J.-P. Mialot, *Pathologie de la reproduction chez les carnivores domestiques*. Ed. du point vét, 1984.
- 55 K. Miki and D. E. Clapham, “Rheotaxis guides mammalian sperm,” *Current Biology*, vol. 23, no. 6, pp. 443–452, 2013.
- 56 C. F. Millette, “Spermatozoa. in, knobil e., neill j.d. (eds).” *Encyclopedia of reproduction*, pp. 586–596, 1998.
- 57 Mortimer and D. Mortimer, “Kinematics of human spermatozoa incubated under capacitating conditions,” *Journal of andrology*, pp. 195–203, 1990.

- 58 S. T. Mortimer, G. Van der Horst, and D. Mortimer, "The future of computer- aided sperm analysis," *Asian journal of andrology*, vol. 17, 2015.
- 59 Neuwinger, J., Behre, H. M., and Nieschlag, E. (1990). External quality control in the andrology laboratory: an experimental multicenter trial. *Fertil. Steril.* 54, 308–314. doi:10.1016/S0015-0282(16)53709-1
- 60 E. Oettlé, "Sperm morphology and fertility in the dog." *Journal of reproduction and fertility. Supplement*, pp. 257–260, 1993.
- 61 W. Ombelet, R. Menkveld, T. Kruger, and O. Steeno, "Sperm morphology as- sessment : historical review in relation to fertility " *Human Reproduction Update*, vol. 1, no. 6, pp. 543–557, 1995.
- 62 Ott R.S., Goffaux M., Thibier M. (1987). Examen morphologique des spermatozoïdes. *El. et Ins.*, 221, 15-20.
- 63 A. Pena, M. Barrio, J. Becerra, L. Quintela, and P. Herradón, "Infertility in a dog due to proximal cytoplasmic droplets in the ejaculate : investigation of the significance for sperm functionality in vitro," *Reproduction in domestic animals*, pp. 471–478, 2007.
- 64 Prins G.S. (1998) ., In : Knobil E., Neill J.D. (eds.) *Encyclopedia of reproduction*. Volume 4. Academic press, San Diego, 360-367p.
- 65 U. Punjabi, C. Wyns, A. Mahmoud, K. Vernelen, B. China, and G. Verheyen, "Fifteen years of belgian experience with external quality assessment of semen analysis," *Andrology*, vol. 4, no. 6, pp. 1084–1093, 2016.
- 66 Reece W.O. (1997). Male reproduction. In : Reece W.O. (eds.). *Physiology of domestic animals*. Second edition. Williams and Wilkins Compagny, Baltimore, 344-365.
- 67 Simon, L. and Lewis, S.E., 2011. Sperm DNA damage or progressive motility: which one is the better predictor of fertilization in vitro?. *Systems biology in reproductive medicine*, 57(3), 133-138.
- 68 Talarczyk-Desole, J., Berger, A., Taszarek-Hauke, G., Hauke, J., Pawelczyk,

- L. and Jedrzejczak, P., 2017. Manual vs. computer-assisted sperm analysis: can CASA replace manual assessment of human semen in clinical practice?. *Ginekologia Polska*, 88(2), 56-60.
- 69 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.
- 70 Van der Horst, G. and du 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.
- 71 Wijchman JG, De Wolf BTHM, Jager S (1995) Evaluation of a computer-aided semen analysis system with sperm tail detection. *Hum Reprod* 10:2090-2095.
- 72 Yániz JL, Soler C, Santolaria P. Computer assisted sperm morphometry in mammals: a review. *Anim Reprod Sci* 2015; 156: 1–12
- 73 Zinaman MJ, Uhler ML, Vertuno E, Fisher SG, Clegg ED (1996) Evaluation of computer-assisted semen analysis (CASA) with IDENT stain to determine sperm concentration. *J Androl* 17:288-292.