

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 : biologie et physiologie de la reproduction

Thème

**Effet de deux milieux de dilution et cinq temps d'incubation sur
les paramètres cinétiques et morphométriques du sperme canin
(CASA HT IVOS II)**

Présenté par : AICHE ABDELLAH

Date de soutenance : 27/07/2022

Devant le jury :

Mr BESSAAD M.A.

MCA/SNVB1

President (e)

Mme BENAZOUZ F.

MAA/SNVB1

Examineur (trice)

Mr LAARBI DOUKARA

MCA/SNV B1

Promoteur.

Mr BELALA R.

MCA/INV B1

Co-Promoteur.

Promotion : 2021-2022

REMERCIEMENT

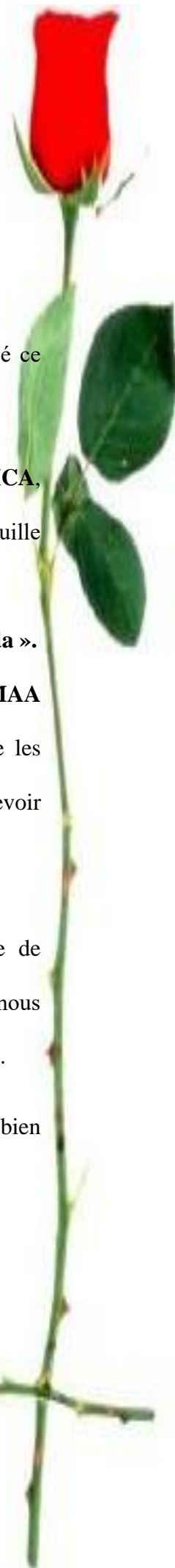
Je remercie en premier lieu dieu le clément miséricordieux qui par sa grâce, j'ai réalisé ce modeste travail.

J'adresse mes remerciements à mon promoteur **Mr LARBI DOUKARA KAMEL « MCA**, enseignant à « **SNV BLIDA** », pour ses encouragements et son sourire rassurant. Qu'il veuille bien recevoir ici l'expression de notre profond respect.

Je remercie mon Co-promoteur **Dr BELALA REDHA « MCA**, enseignant à « **INV Blida** ». Je remercie **Mr BESSAAD M.A. « MCA SNVB1** » et **Mme BENAZOUZ F. « MAA SNVB1** » d'avoir acceptés de faire partie de notre jury ; malgré leurs obligations. Je les remercie pour leurs efforts dans les cours tout le long de l'année, qu'ils veuillent bien recevoir ici l'hommage de notre profond respect.

Je remercie particulièrement **Mr BELALA Redha** le Directeur de la plateforme de biotechnologie et reproduction des carnivores (**P.B.R.C**) de l'université de Blida1 pour nous avoir donné l'accès aux équipements de recherche nécessaires à la réalisation de ce travail.

Je remercie **Mlle MYRA MEDJKOUNE** pour leur aide précieux, Qu'elle veuille bien recevoir ici l'expression de notre profond respect.



REMERCIEMENT

- A monsieur le **DIRECTEUR GENERAL DE LA SURETE NATIONAL.**
- A monsieur le **DIRECTEUR DES UNITES REPUBLICAINES DE SECURITES.**
- A monsieur **LE CDT DU 5 EME GROUPEMENT DES UNITES REPUBLICAINES DE SECURITES CONSTANTINE.**
- A monsieur le **DIRECTEUR DES ENSEIGNEMENTS ET DES ECOLES.**
- A monsieur le **RECTEUR D'UNIVERSITE SAAD DAHLEB BLIDA.**
- A monsieur le **DOYEN DE SNV BLIDA.**
- A monsieur le **CDT DE LA 1 URS SETIF « CPP HOUAS TOUFIK ».**
- A monsieur le **CDT DE LA 11 URS BENI MERRAD BLIDA « CPP FESSIH HAMZA ».**

A tous ceux qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.



DEDICACES

Je dédie ce travail en signe de reconnaissance,

A ceux auxquels je dois ma réussite. Aux personnes les plus chères dans ce monde, à mes parents, pour leur amour, leur dévouement et leur soutien tout au long de mes études. Qu'ils trouvent ici l'expression de ma gratitude.

A mes beaux-parents et toute ma belle-famille.

A ma femme HADJER pour son amour, son soutien et son encouragement, je t'aime davantage.

A mes chers enfants ISMAIL ABDELKOUDOUS, SOUNDOUS RIHEM et ISTABRAK ASSINAT car leurs présence dans ma vie me donne la force et la joie.

A mes frères et mes sœurs et toute ma famille.



SOMMAIRE

INTRODUCTION.....	1
1. L'appareil génital male	3
1.1. Les testicules et les voies spermatiques	
3	
1.2. Le pénis.....	
6	
1.3. 1.3. Les glandes annexes	
8	
2. La semence canine	10
2.1. Caractéristiques générales de la semence canine	10
2.2. Composition de la semence canine	11
2.3. Facteurs de variation des caractéristiques de la semence canine	17
2.4. Récolte de la semence canine	20
3. Evaluation de la semence canine	25
3.1. Les examens utilisés en routine	25
3.1.1. Le spermogramme.....	25
3.1.2. Spermocytogramme (morphologie du spermatozoïde)	28
3.2. Le système CASA (Computerized Assisted Sperm Analysis).....	31
3.2.1. Principe de la technique CASA.....	31
3.2.2. Paramètres générés.....	32
1. MATERIELS ET METHODES	34
1.1. Lieu de l'expérience	34
1.2. Matériel biologique (animaux)	34
1.3. Matériel d'analyse	35
1.3.1. Analyseur CASA (HT IVOS II)	35
1.3.2. Matériels de récolte	35

1.3.3. Matériels de dilution	36
1.4. Méthodes	36
1.4.1. Récolte de la semence	36
1.4.2. Evaluation initiale de la semence	38
1.4.3. Mobilité massale	38
1.4.4. Mobilité individuelle	38
1.5.5. Mesure de la concentration des spermatozoïdes	39
1.5. Préparation des milieux	39
1.5.1. PBS composition	39
1.5.2. Easy Buffer (EBB)	40
1.6. Dilution de la semence	40
1.7. Protocole expérimental	41
1.8. Saisie des données	41
1.9. Analyse statistique.....	41
2. RESULTATS	42
3. DISCUSSION	58
CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS.....	62
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	63

LISTE DES FIGURES

Figure n°1 : Schéma des structures intra-testiculaires.....	3
Figure n°2 : Coupe transversale de la paroi d'un tube séminifère.....	5
Figure n°3 : Modifications morphologiques des cellules germinales au cours de la spermiogénèse.....	5
Figure n°4 : L'appareil génital mâle.....	7
Figure n°5 : Les trois phases de l'éjaculat du chien.....	10
Figure n°6 : Schéma du spermatozoïde de mammifère.....	15
Figure n°7 : Matériel nécessaire à la récolte du sperme chez le chien.....	21
Figure n°8 a : début de la récolte. La tête du chien est maintenue par le propriétaire et orientée vers l'arrière train de la femelle. Massage en arrière des bulbes, retrait du fourreau et application d'une pression en arrière des bulbes.....	23
Figure n°8 b : soulèvement d'un postérieur.....	24
Figure n°8 c : orientation caudale du pénis.....	24
Figure n° 09 : Principales anomalies morphologiques majeures et mineures.....	29
Figure n°10 : Spermatozoïdes colorés à l'éosine-bleu d'aniline.....	30
Figure 11: Hamilton-Thorne IVOS II.....	31
Figure 12 : Cellule de Leja® à quatre chambres.....	32
Figure 13 : représentation schématique de VAP, VCL et VSL.....	33
Figure 14 : Plate-forme Biotechnologique en Reproduction des Carnivores/Université de Blida1.....	34
Figure n°15 : photos des chiens inclus dans la partie expérimentale.....	35
Figure 16: Hamilton-Thorne IVOS II.....	35
Figure n° 17 : matériels de récoltes. (Photo personnel).	36
Figure 18 : la récolte de sperme chez le chien.....	37
Figure 19 : Les trois différentes fractions spermatiques recueillies chez le chien.....	37

Figure 20 : Mettre les trois phases de l'éjaculat dans le bain-marie.....	37
Figure 21 : Dépôt d'une goutte de semence sur une lame pour évaluation.....	39
Figure 22 : Le photomètre SDM1, Minitub.....	39
Figure 23 : préparation du milieu PBS.....	40
Figure 24 : milieu commercial Easy Buffer.....	40
Figure n°25 : Effet du temps d'incubation « T » et milieux de dilution sur les SPZ progressifs évalué par le système HT-IVOS II.....	42
Figure n°26 : Effet du temps d'incubation « T » et milieux de dilution sur les SPZ mobiles évalué par le système HT-IVOS II.....	43
Figure n°27 : Effet du temps d'incubation « T » et milieux de dilution sur la VCL évalué par le système HT-IVOS II.....	44
Figure n°28 : Effet du temps d'incubation « T » et milieux de dilution sur la VAP évalué par le système HT-IVOS II.....	45
Figure n°29 : Effet du temps d'incubation « T » et milieux de dilution sur la VSL évalué par le système HT-IVOS II.....	46
Figure n°30 : Effet du temps d'incubation « T » et milieux de dilution sur la STR évalué par le système HT-IVOS II.....	47
Figure n°31 : Effet du temps d'incubation « T » et milieux de dilution sur la LIN évalué par le système HT-IVOS II.....	48
Figure n°32 : Effet du temps d'incubation « T » et milieux de dilution sur le WOB évalué par le système HT-IVOS II.....	49
Figure n°33 : Effet du temps d'incubation « T » et milieux de dilution sur l'ALH évalué par le système HT-IVOS II.....	50
Figure n°34 : Effet du temps d'incubation « T » et milieux de dilution sur la BCF évalué par le système HT-IVOS II.....	51
Figure n°35 : Effet du temps d'incubation « T » et milieux de dilution sur le pourcentage des Spz normaux évalué par le système HT-IVOS II.....	52

Figure n°36 : Effet du temps d'incubation « T » et milieux de dilution sur le pourcentage des flagelles courbés évalué par le système HT-IVOS II.....	53
Figure n°37 : Effet du temps d'incubation « T » et milieux de dilution sur le pourcentage des flagelles enroulés évalué par le système HT-IVOS II.....	54
Figure n°38 : Effet du temps d'incubation « T » et milieux de dilution sur le pourcentage des gouttelettes distales évalué par le système HT-IVOS II.....	55
Figure n°39 : Effet du temps d'incubation « T » et milieux de dilution sur le pourcentage des gouttelettes proximales évalué par le système HT-IVOS II.....	56
Figure n°40 : Effet du temps d'incubation « T » et milieux de dilution sur le pourcentage des DMR évalué par le système HT-IVOS II.....	57.

LISTE DES TABLEAUX

Tableau n° I : Description des trois phases de l'éjaculat du chien.....	11
Tableau n° II : Anomalies de l'éjaculat.....	18
Tableau n° III : Anomalies des spermatozoïdes.....	19
Tableau n° IV : Identification de chaque animal.....	34
Tableau n° V : Echelle d'appréciation de la mobilité de masse de la semence canine, dérivée de l'échelle de MILOVANOV.	38

LISTE DES ABREVIATIONS

SPZ : Spermatozoïde.

CASA : Computer Aided Sperme Analysis

VCL : Curvilinear Velocity : qui reflète la distance totale que couvre la tête du spermatozoïde au cours de la période d'observation.

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

VAP : Average Path Velocity : correspond à la distance parcourue sur le trajet moyen pendant la durée d'observation.

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

BCF : Beat Cross Frequency : est la fréquence à laquelle la tête du spermatozoïde traverse la trajectoire moyenne, elle est mesurée en Hertz.

STR : Straightness ou rectitude.

LIN : Linéarité.

Résumé :

La présente étude consiste en une évaluation de l'effet de deux solutions de dilution et 5 temps d'incubation à 37°C des Spz canins avant analyse par le système HT-IVOS II sur les paramètres cinétiques et morphométriques. Pour ce faire, 14 éjaculats (n=14) ont été collectés à partir de 6 chiens, et après une évaluation initiale « mobilité microscopique et concentration par photomètre », chaque éjaculat a été divisé en deux aliquotes et dilués dans deux solutions différentes (PBS et une solution tampon commerciale « Easybuffer B ») à la concentration de 25 millions Spz/ml puis incubés à 37°C pendant 5 temps différents (T0, 10, 20, 30 et 40mn après récolte) avant d'être analysés par le système Hamilton-Thorne IVOS II et une lame d'analyse Leja© à 4 chambres et 20µm de profondeur. L'analyseur génère automatiquement 2 pourcentages de mobilité (Mobiles et Progressifs %), 08 paramètres cinétiques et 6 paramètres morphométriques. Ces données sont analysées statistiquement par SPSS en croisant les deux facteurs étudiés (factoriel 2x5). Les résultats démontrent que le temps T0+ 10 mn est le meilleur temps, alors que T0+30mn et T0+ 40 mn sont inadaptés pour l'incubation des Spz canins avant analyse. Le temps T0+20 mn et le milieu PBS sont de bonnes alternatives à T0+10 mn et le milieu EB-B respectivement.

Mots clés : Spermatozoïde – CASA – Analyse cinétique – Analyse morphométriques - Solution de dilution – temps d'incubation.

ملخص:

تتكون الدراسة الحالية من تقييم التأثير على المعلمات الحركية والمورفومترية لاثنين من حلول التخفيف و5 أوقات حضانة عند 37 درجة مئوية من الكلاب Spz قبل التحليل بواسطة نظام HT-IVOS II. للقيام بذلك، تم جمع 14 قذفاً (ن = 14) من 6 كلاب، وبعد التقييم الأولي "للتنقل المجهري والتركيز بواسطة مقياس الضوء، تم تقسيم كل قذف إلى قسمين وتم تخفيفه في محلولين مختلفين (PBS ومخزن مؤقت تجاري) محلول "Easybuffer B" بتركيز 25 مليون Spz / ml ثم حضنه عند 37 درجة مئوية لمدة 5 أوقات مختلفة (T0، 10، 20، 30 و40 دقيقة بعد الحصاد) قبل تحليله بواسطة نظام Hamilton-Thorne IVOS II وشريحة تحليل Leja © مع 4 غرف وعمق 20 ميكروميتر. يولد المحلل تلقائياً نسبتيين مئويتين للتنقل و08 معاملات حركية و6 معاملات شكلية. تم تحليل هذه البيانات إحصائياً بواسطة SPSS من خلال تقاطع العاملين المدروسين (العامل 2 × 5). تشير النتائج إلى أن الوقت T0 + 10 min هو أفضل وقت، في حين أن T0 + 30 min وT0 + 40 min غير مناسبين لحضانة الكلاب Spz قبل التحليل. الوقت T0 + 20 دقيقة ووسيط PBS بدائل جيدة لـ T0 + 10 دقيقة ووسيط EB-B على التوالي.

الكلمات المفتاحية: الحيوانات المنوية -CASA- SPSS -التحليل الحركي -التحليل الصرفي -محلول التخفيف -وقت الحضانة.

Abstract:

The present study consists of an evaluation of the effect of two dilution solutions and five incubation times at 37°C of canine Spz before analysis by the HT-IVOS II system on the kinetic and morphometric parameters. To do this, 14 ejaculates (n=14) were collected from 6 dogs, and after an initial “microscopic mobility and concentration by photometer” evaluation, each ejaculate was divided into two aliquots and diluted in two different solutions (PBS and a commercial buffer solution "Easybuffer B") at a concentration of 25 million Spz/ml then incubated at 37°C for 5 different times (T0, 10, 20, 30 and 40 min after harvest) before being analyzed by the system Hamilton-Thorne IVOS II and a Leja© analysis slide with 4 chambers and 20µm depth. The analyzer automatically generates two mobility percentages, 08 kinetic parameters and 6 morphometric parameters. These data are statistically analyzed by SPSS by crossing the two factors studied (factorial 2x5). The results suggest that the time T0+ 10 min is the best time, whereas T0+ 30 min and T0+ 40 min are unsuitable for the incubation of canine Spz before analysis. Time T0+20 min and PBS medium are good alternatives to T0+10 min and EB-B medium respectively.

Keywords: Sperm - CASA - Kinetic analysis - Morphometric analysis - Dilution solution - incubation time – SPSS.

INTRODUCTION :

La Sûreté Nationale Algérienne a opté depuis longtemps pour l'emploi du chien de travail comme un soutien technique dans les différentes missions d'investigation et de recherche. L'accroissement de la criminalité implique un besoin croissant en ressource canine employée dans la lutte contre cette criminalité. Cependant, le marché Algérien ne permet pas de couvrir ce besoin ni en quantité ni en qualité, à cause des exigences techniques en sélection d'achat des chiens de recherche. Devant cette situation, la Sûreté Nationale œuvre pour le lancement d'un programme d'élevage et de reproduction du chien de travail visant à couvrir ses besoins opérationnels en ressource canine sans recourir à l'importation.

La maîtrise des techniques d'analyse et de conservation de la semence canine sont une condition sine qua non à l'aboutissement de ce programme de reproduction et d'élevage à visée sécuritaire. Cependant, les techniques classiques et manuelles basées sur la microscopie optique souffrent d'une grande subjectivité, imprécision et variabilité intra et inter laboratoires. **(IGUER-OUAD et VERSTEGEN ; 2001)**. Afin de pallier à ces inconvénients, il a été opté pour un analyseur de semence assisté par ordinateur (système CASA) comme alternative aux techniques classiques dans le choix des moyens matériels à réaliser dans le cadre du projet de reproduction et d'élevage de la Sûreté Nationale.

L'analyseur CASA est un système intégré qui, grâce à un logiciel d'analyse d'image « algorithmes » peut détecter et tracer le mouvement des spermatozoïdes en point par point puis reconstituer les trajectoires individuelles et effectuer une analyse informatique pour générer plusieurs paramètres cinétiques reflétant la qualité du mouvement de ces spermatozoïdes. **(IGUER-OUAD et VERSTEGEN ; 2001)**. Ce système permet donc d'évaluer la mobilité des spermatozoïdes avec une grande objectivité comparée à l'œil humain. Ce système mesure aussi la concentration et la morphologie spermatique au même temps que la mobilité avec un temps moyen par analyse de quelques secondes, ce qui représente un grand intérêt dans le cadre d'un centre de reproduction canine. **(RIJSSELAERE et al ; 2004)**.

Cependant, le système CASA souffre également de quelques limites techniques influençant ses résultats, et qui sont attribuables à plusieurs facteurs pré-analytiques tenant aux erreurs humaines de manipulation et de préparation de la semence, mais aussi à d'autres facteurs liés aux conditions d'analyse CASA tel que le choix de la chambre d'analyse, sa profondeur, la température et la concentration d'analyse, la solution de dilution utilisée et la durée d'incubation de la semence avant analyse.

Les deux dernier facteurs soulèvent une problématique pratique dans l'utilisation quotidienne du système CASA que ce soit pour la recherche ou la clinique. Il s'agit du choix de la solution de dilution et du temps d'incubation à 37°C avant analyse.

En effet, beaucoup de laboratoire utilisent les solutions tampon commerciales pour la dilution spermatique ce qui représente un coût supplémentaire de l'analyse notamment avec la cherté de ces solutions qui de plus ne se conservent pas bien et se contaminent après rupture de l'emballage « données non publiées ». Il serait judicieux d'évaluer l'efficacité d'une solution tampon basique synthétisée au laboratoire tel que le PBS comme alternative aux tampons commerciaux.

Pour le temps d'incubation avant analyse, la durée recommandée par le fabricant et rapportés par beaucoup d'auteurs est de 10mn à 37°C. Cependant, dans certaines situations expérimentales qui requièrent l'analyse d'un nombre important d'échantillons ou d'aliqotes du même échantillon notamment dans les études qui croisent plusieurs facteurs (factoriel élevé), le temps d'incubation s'étend à plus de 10min. Il serait donc judicieux d'évaluer l'effet de plusieurs temps d'incubation supérieurs à 10min et étudier leurs effets sur les paramètres analysés.

Ainsi, le présent travail vise à évaluer l'effet de deux milieux de dilution « PBS et Easybuffer B » et 5 temps d'incubation « T0, 10, 20, 30 et 40min » à 37°C avant analyse par le système HT-IVOS II des spermatozoïdes canins sur les paramètres cinétiques et morphométriques.

1. L'APPAREIL GENITAL MALE :

1.1. Les testicules et les voies spermatiques :

1.1.1. Rappels anatomiques (figure n°1) :

Les testicules sont des organes pairs mesurant trois à quatre centimètres de longueur sur trois centimètres de largeur et pesant une vingtaine de grammes chez un chien de grande race. Leur taille est proportionnelle au poids du chien. Les testicules ont une forme globuleuse, presque sphérique. Ils sont situés en région périnéale basse dans le scrotum. (BARONE R., 1978) ; (COLLIN B., 2003) Les testicules sont constitués d'un parenchyme testiculaire parcouru par une structure fibreuse appelée l'albuginée et sont entourés d'une séreuse. Le parenchyme testiculaire se divise en lobules au sein desquels cheminent les tubes séminifères, lieu d'élaboration des gamètes mâles.

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

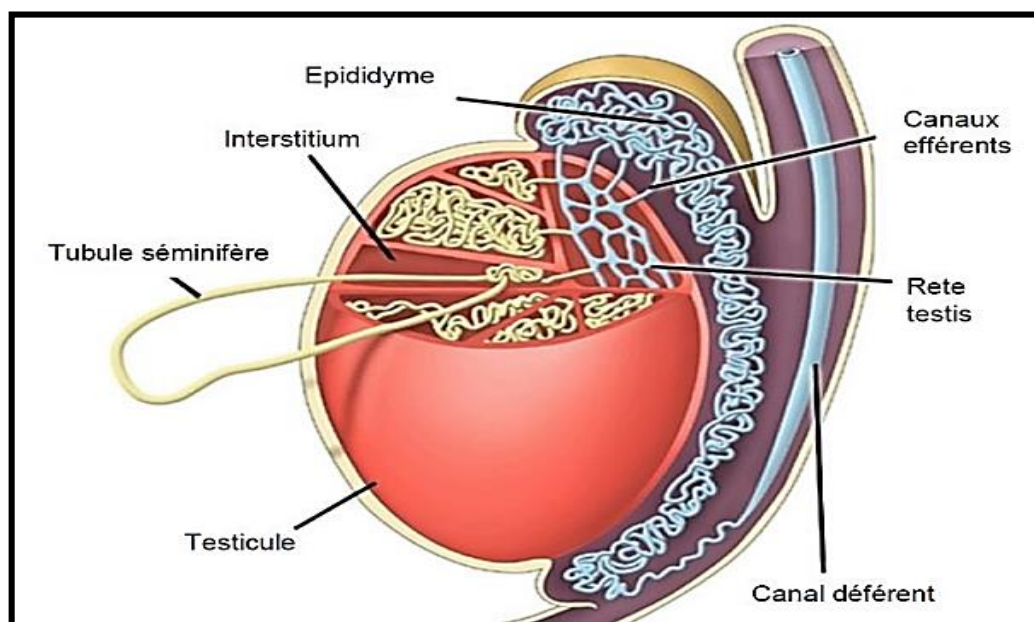


Figure n°1 : Schéma des structures intra-testiculaires (MANDON M., 2015).

1.1.2. Rôles des testicules :

1.1.2.1. La sécrétion d'hormones :

Les cellules de Leydig situées dans le tissu interstitiel des testicules sécrètent la testostérone et des hormones androgéniques (**FONTBONNE et al, 2000**) ; (**REECE W.O., 1997**). 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 (**JOHNSTON et al; 2001a**) ; (**REECE W.O., 1997**).

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. (**JOHNSTON et al; 2001a**); (**FONTBONNE A., 1992**).

1.1.2.2. La spermatogenèse :

La spermatogenèse est la production des gamètes mâles : les spermatozoïdes. La durée de la spermatogenèse 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 de spermatozoïdes par éjaculat (**FONTBONNE A., 1992**).

La spermatogenèse se déroule au sein de la paroi des tubes séminifères en deux étapes successives : la spermatocytogenèse, méiose qui permet de passer du stade spermatogonie au stade spermatide et la spermiogénèse qui permet la différenciation des spermatides en spermatozoïdes (**figure n°2**). Les spermatozoïdes sont finalement libérés dans la lumière des tubes séminifères au cours de la spermiation. Les spermatogonies souches se renouvellent par mitose.

Les spermatozoïdes immatures libérés dans la lumière des tubes séminifères rejoignent l'épididyme au niveau duquel ils vont acquérir leur mobilité et leur aptitude à féconder au cours de deux processus distincts : c'est la maturation épидидymaire qui s'effectue sous contrôle androgénique. Au cours de cette maturation épидидymaire, le noyau des spermatozoïdes subit une condensation importante et de nombreuses modifications lipidiques et protéiques intéressent la membrane plasmique (**figure n°3**).

La grande majorité des spermatozoïdes (70 %) sont ensuite stockés dans la queue de l'épididyme (REECE W.O., 1997). Après une abstinence prolongée, la qualité de la semence peut être altérée du fait d'une surmaturation épидидymaire. (FONTBONNE A., 1992) ; (JOHNSTON et al ; 2001a).

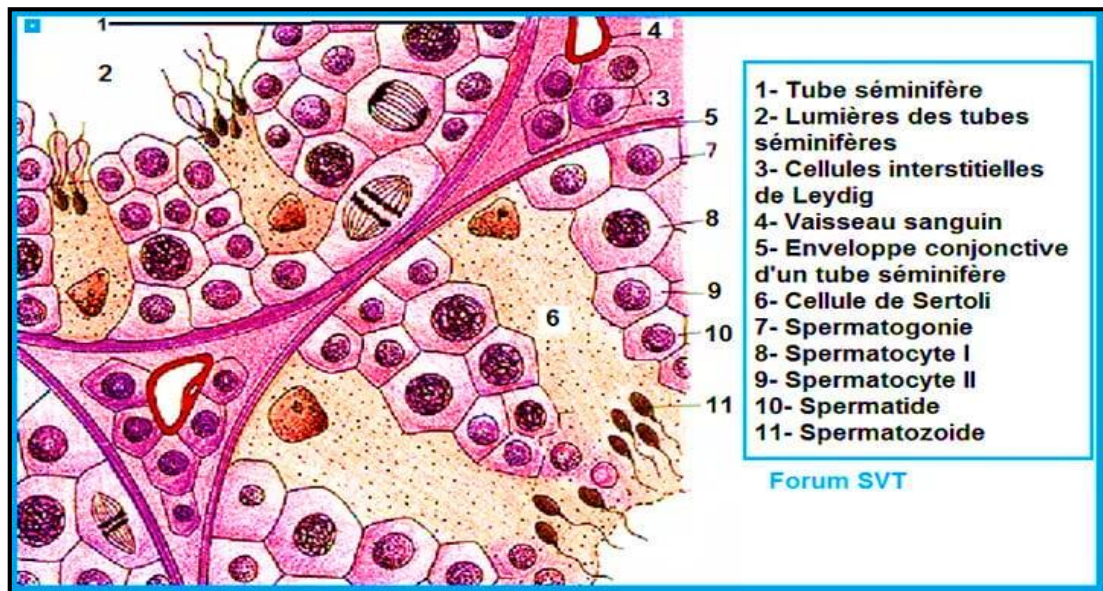


Figure n°2 : Coupe transversale de la paroi d'un tube séminifère (REECE W.O., 1997).

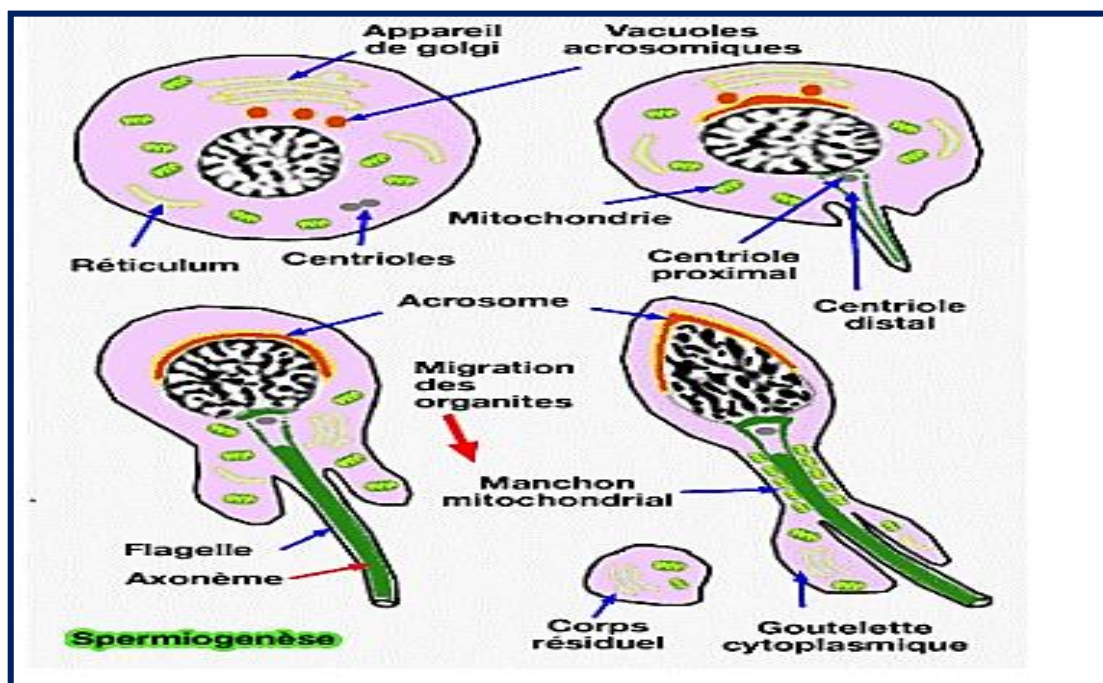


Figure n°3 : Modifications morphologiques des cellules germinales au cours de la spermiogénèse (FONTBONNE A., 1992).

1.2. Le 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 R., 1978**) ; (**COLLIN B., 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 (**COLLIN B., 2003**) ; (**JOHNSTON et al ; 2001a**). Le gland du pénis est divisé en deux parties, une partie allongée cranialement et une partie renflée caudale : le bulbe érectile. Le bulbe érectile génère de nombreux influx nerveux ; c'est cette zone qui doit être stimulée lors de la masturbation. Le gland est constitué du corps spongieux qui est un tissu érectile (**figure n°4**). 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 B., 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 R., 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 R., 1978**) ; (**COLLIN B., 2003**).

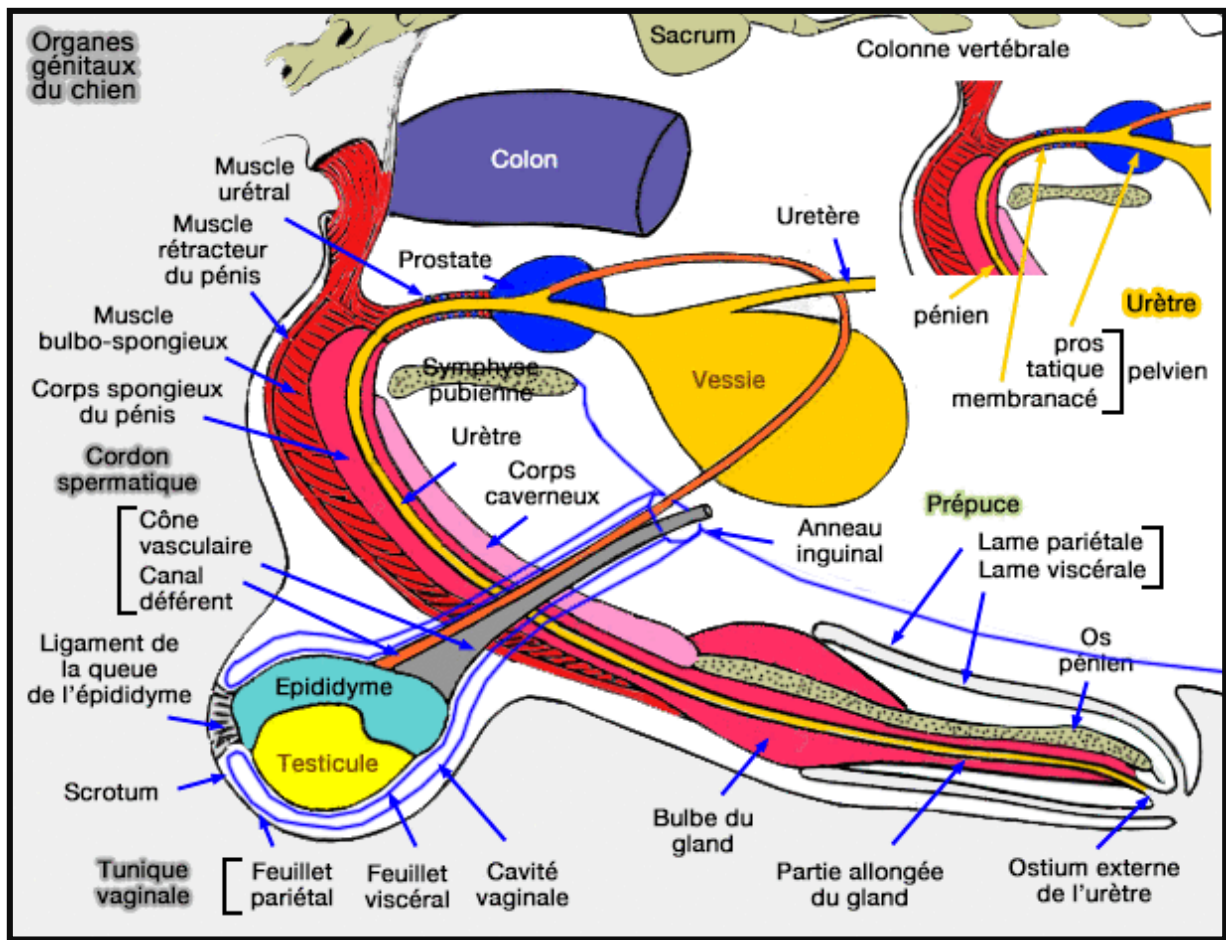


Figure n°4 : L'appareil génital mâle. (PENA MARTINEZ ; 2004)

1.2.2. Rappels de physiologie :

L'âge d'apparition de la puberté est variable d'une race à l'autre. Les grandes races sont plus tardives que les petites. Les premières éjaculations contiennent une faible quantité de spermatozoïdes immatures. (FONTBONNE A., 1992).

1.2.2.1. Erection et 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 25 augmentation du volume notamment au niveau du bulbe érectile (FONTBONNE A., 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 A., 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 (**JOHNSTON et al ; 2001a**), (**REECE W.O., 1997**). Suite à l'érection, il y a accumulation de sperme sous pression et contraction de la prostate et des canaux déférents. La pression augmente jusqu'à l'ouverture du sphincter qui conduit à l'éjaculation. L'éjaculation est sous contrôle du système sympathique via le nerf honteux et du système orthosympathique via le nerf hypogastrique. (**JOHNSTON et al; 2001a**).

Différentes zones peuvent être stimulées pour déclencher l'éjaculation notamment lors de la masturbation. Il s'agit du bulbe érectile, de la pointe du gland, de la face interne des cuisses et du périnée. (**JOHNSTON et al; 2001a**), (**FONTBONNE A., 1992**).

1.2.2.2. Chronologie de l'accouplement :

L'accouplement débute par une érection incomplète permettant tout de même l'intromission du pénis dans les voies génitales femelles grâce à l'os pénien. Le chien présente alors des mouvements de bassin d'avant en arrière qui sont concomitants de l'éjaculation de la phase pré spermatique. Puis l'érection devient maximale. La phase spermatique est éjaculée et le chien se retourne en soulevant un de ses postérieurs. Le chien reste captif dans les voies génitales femelles et la troisième fraction, la phase prostatique est éjaculée pendant de nombreuses minutes. Les spermatozoïdes remontent dans les voies génitales femelles. Leur survie est relativement longue, environ une semaine. Une fois dans les voies génitales femelles, les spermatozoïdes subissent la capacitation et la réaction acrosomique, étapes nécessaires à la fécondation de l'ovocyte. (**JOHNSTON et al ; 2001a**), (**FONTBONNE A., 1992**).

1.3. Les glandes annexes :

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 B., 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 A., 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 A., 1992**).

2. LA SEMENCE CANINE :

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

2.1. Caractéristiques générales de la semence canine :

L'éjaculat de chien est un liquide blanchâtre. Le volume de l'éjaculat dépend de la race et de l'individu ; il varie de un à quatre-vingt millilitres (JOHNSTON et al ; 2001b). L'éjaculat de chien est composé de trois fractions présentant des caractéristiques différentes tant au niveau de leur origine que de leur composition et de leur volume (figure n°5 et tableau n° I).

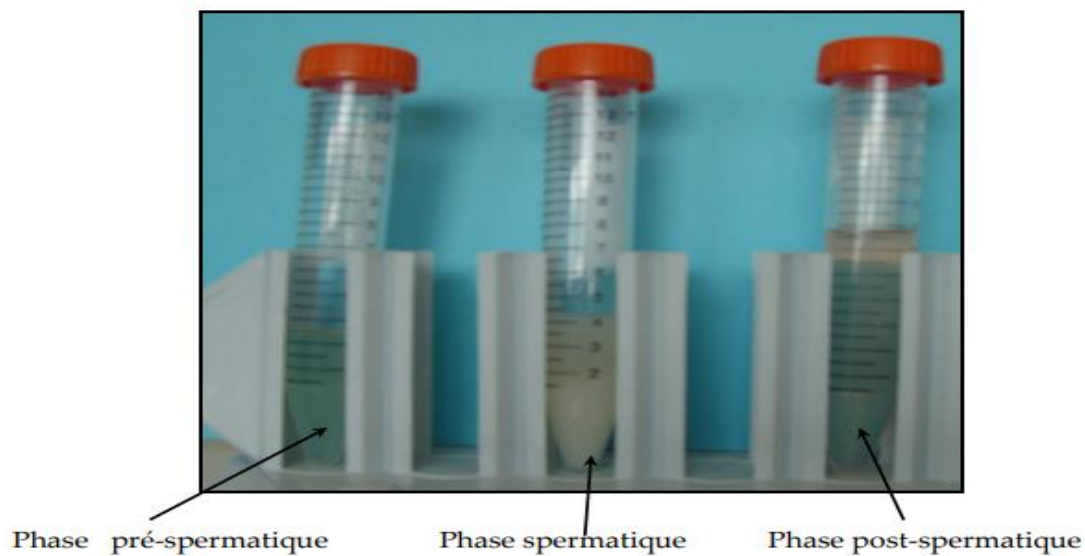


Figure n°5 : Les trois phases de l'éjaculat du chien. (FONTBONNE et DUMONT ; 1992).

Tableau n° I : Description des trois phases de l'éjaculat du chien. (FONTBONNE et DUMONT ; 1992).

	Origine	Aspect	Volume	pH	Composition
Phase pré-spermatique	Prostatique	Blanchâtre	0.2 à 2 ml	6.2 – 6.5	+ Moins de 3 millions de spermatozoïdes + Liquide prostatique
Phase spermatique	Epididymaire	Plus ou moins laiteuse	0.5 à 3.5 ml	6.3 – 6.6	+ Très riche en spermatozoïdes + Sécrétion épидидymaire
Phase post-spermatique	Prostatique	Clair	4 à 30 ml et plus	6.5 – 7.0	+ Très rare spermatozoïdes + Liquide prostatique

2.2.Composition de la semence canine :

2.2.1. Le liquide séminal :

2.2.1.1.Définition :

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

2.2.1.2.Composition :

Le liquide séminal contient :

➤ **des glucides ;**

Les glucides constituent le substrat énergétique nécessaire au métabolisme des spermatozoïdes. Le sperme canin est particulièrement pauvre en fructose contrairement à celui des autres mammifères. Ceci est à mettre en relation avec l'absence de glande vésicale chez le chien. Cependant, les spermatozoïdes de chien ont gardé la capacité d'utiliser le fructose par les voies aérobie et anaérobie (**COLE et CUPPS ; 1959**).

➤ **des lipides ;**

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

➤ **des protéines ;**

Une partie des protéines provient du plasma sanguin comme l'albumine, la globuline, la transferrine, les glycoprotéines et les immunoglobulines ; les autres sont sécrétées par la prostate comme les enzymes protéolytiques, les phosphatases et les glucuronidases. (**COLE et CUPPS ; 1959**) ; (**PRINS G.S ; 1998**).

➤ **des ions et des électrolytes :**

Du calcium (nécessaire au fonctionnement des spermatozoïdes), du sodium, du chlore, du zinc (d'origine prostatique, il posséderait un pouvoir bactériostatique), du potassium, du fer... (**PRINS G.S; 1998**).

➤ **diverses autres molécules :**

- **de l'acide citrique** en faible quantité. Cette pauvreté du sperme canin en acide citrique est à mettre en relation avec l'absence de glande vésicale chez le chien (**COLE et CUPPS ; 1959**).

- **de la glycérylphosphorylcholine**, d'origine épидидymaire. Cette molécule a été utilisée comme marqueur de la sécrétion épидидymaire. Le rôle de cette molécule n'est pas entièrement élucidé mais une estérase capable de cliver cette molécule et de libérer la choline a été mise en évidence dans les voies génitales femelles. (**PRINS G.S; 1998**).

➤ **des hormones** : hormones stéroïdiennes, prolactine (hormone qui stimulerait la mobilité des spermatozoïdes et qui augmenterait leur longévité)... **(PRINS G.S ; 1998)**.

Des éléments figurés peuvent également être trouvés dans le liquide séminal. Ils sont rares et dégénérés. Des cellules épithéliales originaires de l'urètre ou de la vessie, des lymphocytes, quelques globules rouges provenant de l'éclatement de petits vaisseaux du pénis peuvent être présents dans le liquide séminal **(FONTBONNE A., 1995)** ; **(FONTBONNE et DUMONT ; 1992)**. De plus, la semence n'étant pas stérile, des microorganismes de la flore naturelle des muqueuses pénienne et préputiale peuvent être retrouvés. **(JOHNSTON et al; 2001b)**.

2.2.1.3. Rôles :

Les rôles du liquide séminal sont doubles. Le liquide séminal intervient à la fois dans le transport et la nutrition des spermatozoïdes. Cependant, ce liquide n'est pas absolument nécessaire à la fécondation. En effet, des expériences ont montré que des spermatozoïdes prélevés dans l'épididyme conservent leurs propriétés fécondantes in vitro. Toutefois, in vivo, le liquide séminal augmente le pouvoir fécondant des spermatozoïdes. **(PRINS G.S; 1998)**.

2.2.2 Le spermatozoïde :

2.2.2.1. Définition :

Le spermatozoïde est le gamète mâle. C'est une cellule haploïde hautement spécialisée, de forme oblongue. Il mesure soixante-deux à soixante-six micromètres ; la queue mesure à elle seule cinquante-cinq micromètres. **(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 C.F., 1998)**.

2.2.2.2. Description du spermatozoïde (figure n°6) :

2.2.2.2.1. La tête :

La tête du spermatozoïde est aplatie dorso-ventralement. Elle contient le noyau, l'acrosome, le cytosquelette et le cytoplasme. Le noyau est l'organite contenant le matériel génétique. Il est haploïde c'est-à-dire qu'il contient un seul exemplaire de chromosomes. La chromatine est très condensée. L'ADN est associé à des protamines, protéines basiques ayant la même fonction que les histones des cellules somatiques. **(MILLETTE C.F., 1998)**.

L'acrosome est une structure en forme de bonnet propre aux spermatozoïdes. C'est un compartiment cellulaire coiffant le pôle antérieur du noyau. L'acrosome est une extension de l'appareil de Golgi se formant lors des dernières étapes de la spermatogenèse. Il contient un équipement enzymatique intervenant au cours de la fécondation, notamment des enzymes hydrolytiques permettant le passage de la zone pellucide et des enzymes intervenant dans la fusion du spermatozoïde avec l'ovocyte. Les deux protéines majoritaires de l'acrosome sont l'acrosine et la hyaluronidase. (MILLETTE C.F., 1998).

2.2.2.2. Le flagelle :

Le flagelle est l'élément moteur du spermatozoïde qui lui permet d'atteindre l'ovocyte et de pénétrer dans celui-ci. Le flagelle se divise en quatre portions : la pièce connective, la pièce intermédiaire, la pièce principale et la pièce terminale. (MILLETTE C.F., 1998).

Le flagelle est constitué de l'axonème, d'une gaine mitochondriale, d'une couche périphérique de fibres denses et d'une gaine fibreuse. L'axonème se situe en position centrale. Il est constitué d'une paire de microtubules centrale entourée de neuf paires de microtubules. Les microtubules sont constitués de sous-unités de α et β - tubulines associées à des protéines motrices dont la kinésine. Au niveau de la pièce intermédiaire, une spirale de mitochondries enveloppe l'axonème. Les mitochondries produisent l'ATP indispensable à la production d'énergie permettant le glissement des microtubules dans l'axonème. Au niveau de la pièce principale, la gaine fibreuse entoure l'axonème. La fibre dense est présente à la périphérie de l'axonème au niveau de la pièce intermédiaire et d'une partie de la pièce principale. (MILLETTE C.F., 1998).

2.2.2.3. La membrane cytoplasmique :

La membrane cytoplasmique est constituée de lipides : des 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 C.F., 1998).

C'est une membrane hautement spécialisée divisée en domaines. Au niveau de la pièce intermédiaire du flagelle, la membrane plasmique contient des protéines nécessaires à la production de l'ATP mitochondriale et nécessaires à la modulation du glissement des microtubules. Au niveau de la tête des spermatozoïdes, la membrane cytoplasmique renferme des protéines intervenant dans la reconnaissance cellulaire et dans la fusion des membranes au cours de la fécondation. (MILLETTE C.F., 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 C.F., 1998).

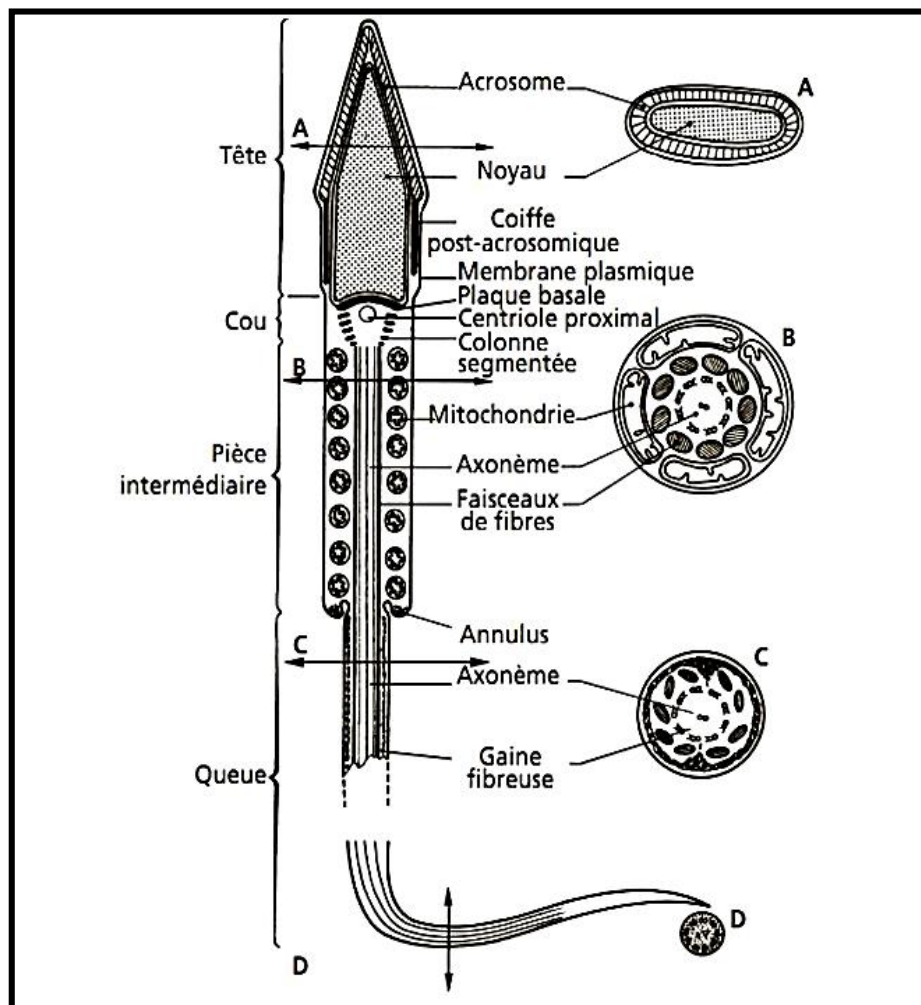


Figure n°6 : Schéma du spermatozoïde de mammifère (LE MOIGNE et FOUCRIER ; 2009).

2.2.2.3. Capacitation et fécondation :

La fécondation est l'union du noyau d'un spermatozoïde avec le noyau de l'ovocyte au sein du cytoplasme activé de l'ovocyte (SCHATTEN G. ; 1998). Elle correspond à un enchaînement d'évènements. La première étape correspond à la capacitation du spermatozoïde au cours de laquelle le spermatozoïde subit des changements protéiques et lipidiques et devient hyperactivé. (FONTBONNE A., 1992). Avant leur capacitation, les spermatozoïdes présentent une mobilité linéaire. Après la capacitation, les spermatozoïdes acquièrent une mobilité beaucoup moins linéaire avec des mouvements de flagelles plus amples. Cette mobilité facilite la traversée de la zone pellucide particulièrement élastique chez les mammifères.

Au niveau cellulaire, la capacitation se caractérise par une modification des protéines et des lipides membranaires avec une diminution du ratio cholestérol sur phospholipides. La perte de cholestérol est à l'origine d'une augmentation du pH intracellulaire due à une augmentation des bicarbonates intracellulaires. Cette augmentation de pH entraîne une augmentation de la concentration en calcium et une augmentation de l'activité de l'adénylcyclase. De plus, certains récepteurs membranaires participants à l'attachement du spermatozoïde à l'ovocyte sont exprimés. (BEDFORD et CROSS ; 1998).

Lorsque le gamète mâle pénètre les enveloppes de l'ovocyte, il y a fusion de la partie antérieure de la membrane plasmique du spermatozoïde avec la membrane externe de l'acrosome. C'est la réaction acrosomique. Cette fusion est suivie du relargage progressif des enzymes de l'acrosome et notamment des enzymes hydrolytiques qui permettent la pénétration du spermatozoïde dans l'ovocyte. (BEDFORD et CROSS; 1998) ; (MILLETTE C.F., 1998).

L'attachement du spermatozoïde à l'ovocyte est suivi de la fusion de leurs membranes plasmiques et de l'entrée du spermatozoïde. Cette pénétration entraîne une activation métabolique de l'ovocyte ainsi que la réaction corticale. Celle-ci correspond à la digestion protéolytique des sites d'attachements des spermatozoïdes et à une modification enzymatique des enveloppes de l'ovocyte ; ces changements permettent d'éviter la polyspermie. (SCHATTEN G.; 1998).

Enfin, il y a formation des pronucléi mâle et femelle et fusion des noyaux permettant l'obtention d'un zygote diploïde. La première division cellulaire peut alors débuter. (SCHATTEN G.; 1998).

2.3. Facteurs de variation des caractéristiques de la semence canine :

La qualité de la semence canine est influencée par l'état général du chien, par son alimentation et par son poids qui a une incidence directe sur le nombre de spermatozoïdes totaux et sur le volume spermatique. L'âge du chien a également une influence ; en effet, la qualité de la semence peut diminuer dès quatre ou cinq ans chez certaines races (**FONTBONNE et DUMONT ; 1992**). De plus, après la puberté, la première éjaculation contient souvent un nombre important de spermatozoïdes anormaux ou morts. (**FELDMAN et NELSON ; 1987**).

La qualité de la semence est également liée à la fréquence des éjaculations. Deux à trois éjaculations par semaines n'altèrent pas la qualité de la semence. A l'inverse, une abstinence prolongée va diminuer la qualité de celle-ci. (**FELDMAN et NELSON ; 1987**) ; (**FONTBONNE et al ; 2000**). Dans une étude portant sur soixante-cinq chiens, England prélève les chiens à environ une heure d'intervalle. Il remarque que la libido n'a pas variée entre les deux prélèvements mais que les caractéristiques quantitatives de la seconde fraction de l'éjaculat du deuxième prélèvement sont moins bonnes dans soixante-neuf pour cent par rapport à celles du premier prélèvement avec une diminution du volume de la fraction spermatique, une diminution de la concentration et du nombre total en spermatozoïdes. Cependant, la mobilité ainsi que les anomalies morphologiques n'étaient pas significativement différentes lors des deux prélèvements. Ainsi, l'ajout du deuxième prélèvement au premier permet d'augmenter le nombre total de spermatozoïdes d'environ soixante-dix pour cent par rapport à un unique prélèvement. Dans cette même étude, England met également en évidence l'influence de la race sur la qualité de la semence.

En effet, plusieurs races ont été utilisées dans son étude et il montre que le volume de la seconde fraction de l'éjaculat des bergers allemands est significativement plus important que celui des neuf autres races utilisées et que bien que la concentration en spermatozoïdes soit inférieure chez le berger allemand, le nombre total de spermatozoïdes est nettement supérieur. Il faut noter que dans cette étude, la majorité des autres chiens était de taille et de poids similaires aux bergers allemands (**ENGLAND G.C.W., 1999**).

Certains auteurs mettent en évidence une influence saisonnière sur le nombre total de spermatozoïdes, la concentration en spermatozoïdes et sur le nombre de formes anormales. Ainsi, la concentration est la plus importante à la fin du printemps et au début de l'été et est la plus basse à la fin de l'été et au début de l'automne. De plus, il y a une augmentation des formes anormales pendant l'été. (FELDMAN et NELSON ; 1987) ; (JOHNSTON et al ; 2001b).

La taille de la prostate a quant à elle, une influence sur le volume de l'éjaculat qui est proportionnel à la taille de celle-ci. Cependant, les chiens souffrant d'une hypertrophie bénigne de la prostate ont un volume spermatique moins important en comparaison avec des chiens sains ayant une prostate de taille équivalente. (FELDMAN et NELSON ; 1987). Des anomalies plus spécifiques de la semence peuvent intéressées les spermatozoïdes ou bien l'éjaculat complet (tableaux n° II et n° III). Ces anomalies ont des origines diverses.

Tableau n° II : Anomalies de l'éjaculat. (FONTBONNE A., 1995).

Anomalie	Description	Origine possible
Aspermie	Absence de sperme	<ul style="list-style-type: none"> * Ejaculation rétrograde * Anomalie congénitales (agénésie des canaux déférents...) * Anomalie acquise (obstruction des conduites génitales suite orchite, épидидymites, urétrite...)
Oligospermie	Volume de sperme faible	<ul style="list-style-type: none"> * Prostate (notamment suite aux traitements anti-androgéniques) * Ejaculation rétrograde

Tableau n° III : Anomalies des spermatozoïdes. (FONTBONNE A., 1995).

Anomalies	Description	Origine
Azoospermie	Absence totale des spermatozoïdes	<ul style="list-style-type: none"> * Prostatite * Affection urinaire (cystite, urétrite) * Anomalies congénitale (hypoplasie testiculaire, ectopie testiculaire)
Oligozoospermie	Spermatozoïdes peu nombreux	<ul style="list-style-type: none"> * Anomalies acquises (cf. azoospermie) * Causes hormonales (tumeurs dans axe hypothalamo-hypophysaire, tumeur testiculaire, hypothyroïdie, syndrome de Cushing, maladie d'Addison) * Causes iatrogènes (corticostéroïdes, anabolisants, antifongiques...)
Asthénozoospermie	Spermatozoïdes peu mobiles	<ul style="list-style-type: none"> * Causes infectieuses (brucellose) * Autres causes : radiation, hyperthermie, affections auto-immunes, génétique * Idiopathiques
Tératozoospermie	Nombre important de spermatozoïdes anormaux	
OAT	Oligo-asthénotératospermie	

2.4. Récolte de la semence canine :

2.3.1. 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 reproduits depuis longtemps, chez des mâles qui ont laissés plusieurs chiennes vides ou qui ont fait de petites portées ou enfin simplement avant une saillie afin d'évaluer la qualité de la semence ;
- l'objectivation d'une pathologie ; ainsi, une évaluation de la semence peut être indiquée en cas d'écoulements préputiaux, d'hématospermie ou d'hématurie (**KUTZLER M.A., 2005**).

2.3.2. Méthodes de récolte du sperme :

2.3.2.1. Présentation des différentes techniques :

La méthode la plus utilisée actuellement pour le prélèvement de semence chez le chien est la récolte par stimulation manuelle. 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**). L'électroéjaculation est une autre méthode utilisée principalement chez le chat. Cette méthode de récolte n'est pas couramment utilisée car elle nécessite une anesthésie générale et qu'elle augmente les risques de contamination de la semence par l'urine. (**JOHNSTON et al ; 2001b**).

2.3.2.2. La récolte par stimulation manuelle :

2.3.2.2.1. Matériel nécessaire :

Le matériel nécessaire à la récolte de la semence par stimulation manuelle 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°7**). L'idéal est de laisser les cônes dans une étuve afin qu'ils soient tièdes au moment du prélèvement (**FONTBONNE et DUMONT ; 1992**).

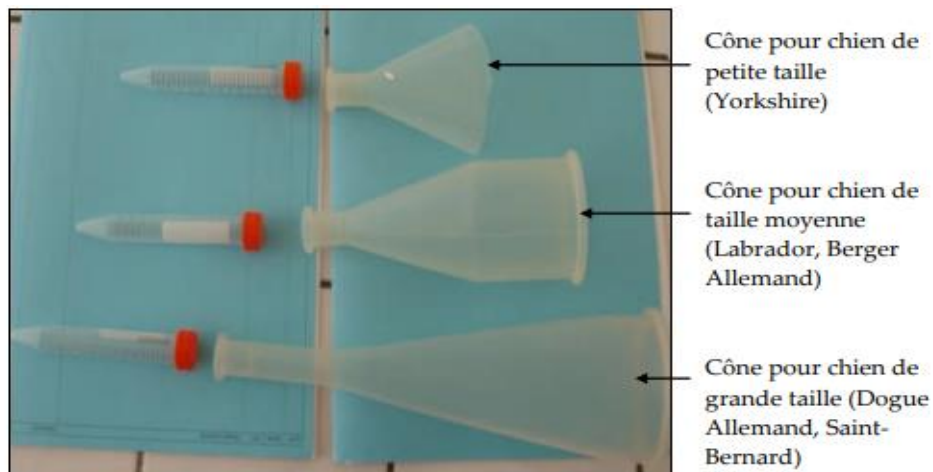


Figure n°7 : Matériel nécessaire à la récolte du sperme chez le chien. (**FONTBONNE et DUMONT ; 1992**).

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... Puis, les cônes doivent être soigneusement séchés afin d'ôter les résidus d'eau qui sont toxiques pour les spermatozoïdes. (**FONTBONNE et DUMONT ; 1992**).

2.3.2.2.2. Environnement de la récolte :

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

2.3.2.2.3. Mise en condition du chien :

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

Des phéromones synthétiques peuvent être appliquées sur la vulve et l'arrière train d'une femelle en œstrus voire sur un mâle castré (Feldman et Cône pour chien de petite taille (Yorkshire) Cône pour chien de taille moyenne (Labrador, Berger Allemand) Cône pour chien de grande taille (Dogue Allemand, Saint-bernard). **(FELDMAN et NELSON ; 1987).** Plus simplement, des écouvillons de chiennes en œstrus peuvent être conservés à - 20 °C et présentés à la truffe du mâle pendant le prélèvement ou être appliqués à la base de la queue d'une chienne. **(KUTZLER M.A., 2005).** L'injection de molécules peut également être pratiquée. Par exemple, l'injection de GnRH soixante minutes avant le prélèvement induit un relargage de testostérone et augmente ainsi la libido du chien. Cette méthode est contre indiquée chez les chiens présentant une hyperplasie bénigne de la prostate ou un adénome des glandes surrénales. L'administration de testostérone doit être prohibée car elle exerce un rétrocontrôle négatif à l'origine d'une diminution de la sécrétion de testostérone endogène et d'une diminution de la spermatogénèse. **(JOHNSTON et al ; 2001b).**

2.3.2.2.4. Stimulation digitale :

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 M.A., 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 n°8 a**). 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 M.A., 2005**) ; (**FONTBONNE et DUMONT ; 1992**). Le chien éprouve dans ce cas de l'inconfort voire de la douleur et l'érection peut s'arrêter (**FELDMAN et NELSON ; 1987**). Une pression est ensuite appliquée à l'arrière des bulbes érectiles avec le pouce et l'index.

Cette pression mime la coaptation vaginale du pénis lors du coït (**FONTBONNE et DUMONT ; 1992**) Le chien va présenter des mouvements de bassin d'avant en arrière pendant quelques minutes puis il va s'arrêter et soulever un postérieur pour essayer de se retourner (**figure n°8 b**). Le pénis peut alors être orienté caudalement. La pression en arrière des bulbes érectiles doit être maintenue (**KUTZLER M.A., 2005**). A ce stade, l'érection est totale et l'éjaculation des deux premières phases a lieu ; elle dure entre deux et cinq minutes (**FELDMAN et NELSON ; 1987**).

Si l'érection a tendance à diminuer, un massage de l'urètre périnéal peut être nécessaire (**FONTBONNE et DUMONT ; 1992**). La séquence se poursuit par l'éjaculation de la troisième phase ; la récolte intégrale de celle-ci n'est pas nécessaire car elle peut être longue. Il est cependant important de récolter une quantité suffisante de la troisième phase afin d'en observer l'aspect (**figure n°8 c**).



Figure n°8 a : début de la récolte. La tête du chien est maintenue par le propriétaire et orientée vers l'arrière train de la femelle. Massage en arrière des bulbes, retrait du fourreau et application d'une pression en arrière des bulbes. (**FONTBONNE et DUMONT ; 1992**)



Figure n°8 b : soulèvement d'un postérieur. (FONTBONNE et DUMONT ; 1992).



Deuxième phase Echange des cônes pour récupérer la troisième phase

Figure n°8 c : orientation caudale du pénis. (FONTBONNE et DUMONT ; 1992).

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

3. EVALUATION DE LA SEMENCE CANINE :

L'évaluation de la semence est une étape importante pour estimer la fertilité du mâle (**EILTS B.E. ; 2005**). L'évaluation de la semence fraîche a pour but d'évaluer le fonctionnement testiculaire et épидидymaire alors que l'évaluation de la semence congelée permet d'évaluer les dommages subis par les spermatozoïdes au cours du processus de congélation (**PENA MARTINEZ ; 2004**). Dans cette partie, nous évoqueront les examens de routine, réalisables par le vétérinaire et nécessitant peu de matériel, les examens réalisés en seconde intention et les nouvelles méthodes d'études du sperme utilisées dans les centres spécialisés.

3.1. Les examens utilisés en routine :

Ces examens sont simples ; ils sont effectués avant une insémination artificielle, une congélation de semence ou plus simplement dans le cadre d'une analyse de sperme en vue d'en apprécier sa qualité. Il s'agit du spermogramme et du spermocytogramme.

3.1.1. Le spermogramme :

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

3.1.1.1. Le volume :

La mesure du volume donne quelques indications ; si celui-ci est trop faible, il se peut que la phase spermatique n'ait pas été entièrement (**FONTBONNE et DUMONT ; 1992**). Si l'éjaculat n'a pas été fractionné, sa mesure a peu de signification car la phase post-spermatique à un volume beaucoup plus important que celui des autres phases. De plus, le volume de l'éjaculat dépend également de la taille du chien, de son âge et de la fréquence de ses éjaculations. Le volume est également important pour calculer le nombre total de spermatozoïdes dans l'éjaculat. (**JOHNSTON et al; 2001b**).

3.1.1.2. L'aspect :

L'aspect de l'éjaculat est un élément important. Par exemple, l'opacité de la phase spermatique donne une première indication sur la concentration en spermatozoïdes de l'éjaculat.

Certaines modifications de couleur peuvent orienter vers des affections spécifiques :

- la couleur jaune indique la présence d'urine ou la présence d'un exsudat inflammatoire ;
- la couleur verte met en évidence la présence de pus ;
- la couleur rouge ou brune indique la présence de sang respectivement en nature ou digéré. Le sang digéré provient généralement de la prostate. Le sang en nature peut provenir de petites hémorragies qui se produisent pendant l'érection ;
- un échantillon clair est évocateur d'une azoospermie (absence de spermatozoïdes dans l'éjaculat). (**FELDMAN et NELSON ; 1987**) ; (**FRESHMAN J.L. ; 2002**), (**JOHNSTON et al ; 2001b**).

La présence d'éléments anormaux tels que l'urine, le sang ou le pus peut entraîner une diminution de la concentration, de la motilité et de la vitalité des spermatozoïdes. Une coloration anormale du sperme nécessite donc un approfondissement de l'examen du tractus génital. (**FELDMAN et NELSON ; 1987**).

La présence de sang dans l'éjaculat entraîne également une altération de la qualité de la semence lors de la conservation de celle-ci. En effet, la présence d'une petite quantité de sang (supérieure à 2%) a des effets néfastes sur la qualité du sperme après congélation-décongélation. La cryoconservation entraîne une lyse des globules rouges à l'origine d'une libération d'hémoglobine qui altère les spermatozoïdes. Par contre, la présence de sang a peu d'effets néfastes sur la qualité de la semence lors de la réfrigération. (**RIJSSELAERE et al; 2004**).

3.1.1.3. L'odeur :

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

3.1.1.4. Le pH :

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

3.1.1.5. La mobilité :

La mobilité des spermatozoïdes est étudiée au microscope sur platine chauffante à 37°C entre lame et lamelle ; elle doit être effectuée rapidement après le prélèvement. La mobilité est diminuée par les températures extrêmes, les diluants acides, l'urine, le pus, le sang et le lubrifiant. Il faut noter que la mobilité est augmentée à proximité des bulles d'air et est diminuée au niveau des bords de la lamelle. **(FELDMAN et NELSON ; 1987) ; (JOHNSTON et al ; 2001b).**

Dans un premier temps, le sperme est regardé au faible grossissement de façon à apprécier la mobilité massale, c'est-à-dire les mouvements de réunions et de dispersion des spermatozoïdes. Cette observation est subjective. Une échelle d'appréciation dérivée de celle des bovins peut être utilisée : une note variant de zéro à cinq est attribuée.

Le zéro correspond à un échantillon dans lequel les spermatozoïdes sont tous immobiles et le cinq correspond à un échantillon dans lequel les spermatozoïdes ont un mouvement d'ensemble dense donnant une impression de vagues. Dans un deuxième temps, le sperme est examiné au fort grossissement entre lame et lamelle afin d'apprécier la mobilité progressive : le pourcentage de spermatozoïdes qui sont en mouvement ainsi que leur vitesse et leur trajectoire est estimé. Les spermatozoïdes qui traversent rapidement le champ du microscope sont nommés spermatozoïdes fléchants. **(FONTBONNE et DUMONT ; 1992) ; (FONTBONNE A., 1995).**

Si la semence est trop concentrée, elle est diluée dans une solution tampon saline. L'évaluation de la mobilité permet également d'observer d'éventuelles agglutinations des spermatozoïdes. **(FRESHMAN J.L. ; 2002).**

Cet examen ne permet cependant pas de connaître la fertilité du mâle avec certitude car des spermatozoïdes mobiles peuvent présenter des altérations de la membrane plasmique ou de l'acrosome qui auront des répercussions sur la fertilité mais pas sur la mobilité. **(EILTS B.E.; 2005).**

L'interprétation de la concentration est délicate car elle dépend de la quantité de fluide prostatique récoltée lors du prélèvement. **(FELDMAN et NELSON ; 1987) ; (FONTBONNE et DUMONT ; 1992).**

3.1.1.6. La vitalité :

La vitalité est le pourcentage de spermatozoïdes vivants. Ce paramètre donne une bonne indication de la qualité de la semence. L'éosine-nigrosine est un colorant permettant d'évaluer la vitalité. En effet, il permet de différencier les spermatozoïdes morts qui seront colorés en rose des spermatozoïdes vivants qui eux resteront incolores. Il faut toutefois noter que cette coloration donne des résultats variables suivant l'origine du colorant et le temps de trempage dans celui-ci. (**FONTBONNE A., 1995**).

3.1.2. Spermocytogramme (morphologie du spermatozoïde) :

Le spermocytogramme est l'étude de la morphologie des spermatozoïdes. Elle s'effectue sur un étalement de semence colorée au microscope optique en contraste de phase.

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 lors de la préparation de la semence. 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 n°9**). (**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 E. ; 1993**).

Les colorants utilisables pour observer la morphologie des spermatozoïdes sont l'éosine-nigrosine, l'éosine-bleu d'aniline (**figure n°10**), le Spermac®... Les spermatozoïdes sont regardés au grossissement $\times 400$. (**FONTBONNE A., 1995**).

L'éosine-nigrosine permet également de reconnaître les spermatozoïdes ayant déjà effectué leur réaction acrosomique et qui ne sont donc plus fertiles. En effet, l'acrosome des spermatozoïdes ayant effectué leur réaction acrosomique sera coloré. (**EILTS B.E. ; 2005**).

Le Spermac® est un colorant qui permet de vérifier l'intégrité de l'acrosome des spermatozoïdes. Un frottis avec une goutte de semence est effectué. Puis, après fixation, la lame est plongée dans trois colorants successifs. Avec cette coloration, l'acrosome apparaît vert, le noyau rouge, la région équatoriale verte pâle, la pièce intermédiaire et la queue verte. Cette coloration présente l'avantage d'être rapide (quinze minutes de préparation), facile d'emploi et elle permet de déterminer le statut de l'acrosome. (**GUERIN V., 1997**).

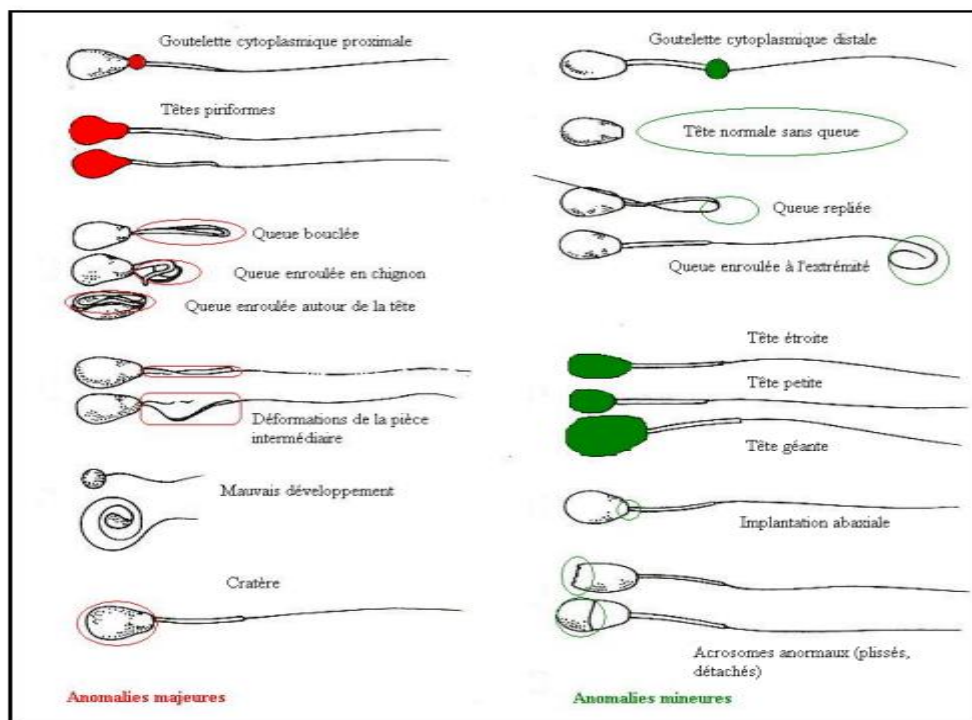


Figure n° 09 : Principales anomalies morphologiques majeures et mineures. (**OETTLE E. ; 1993**).

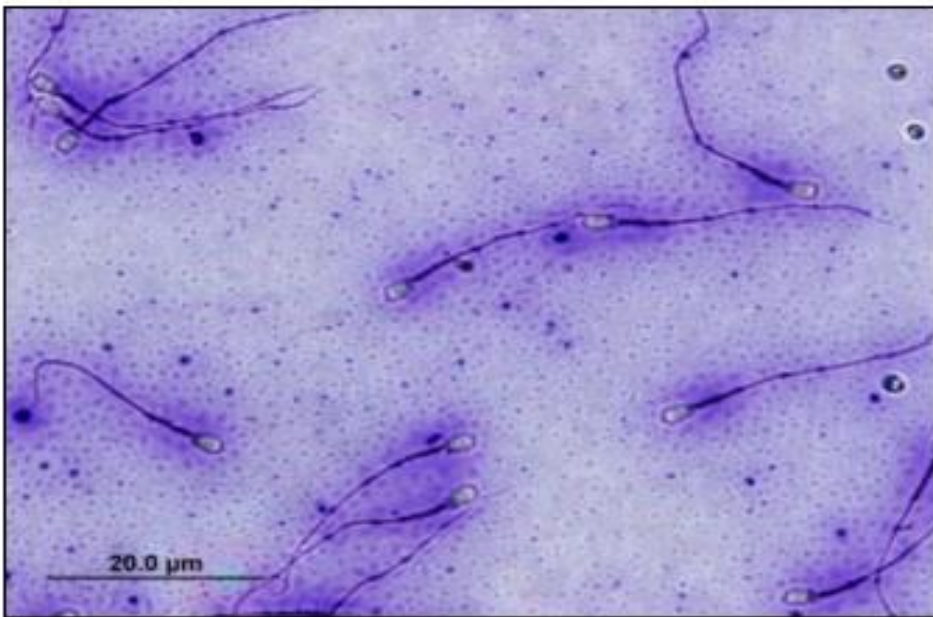
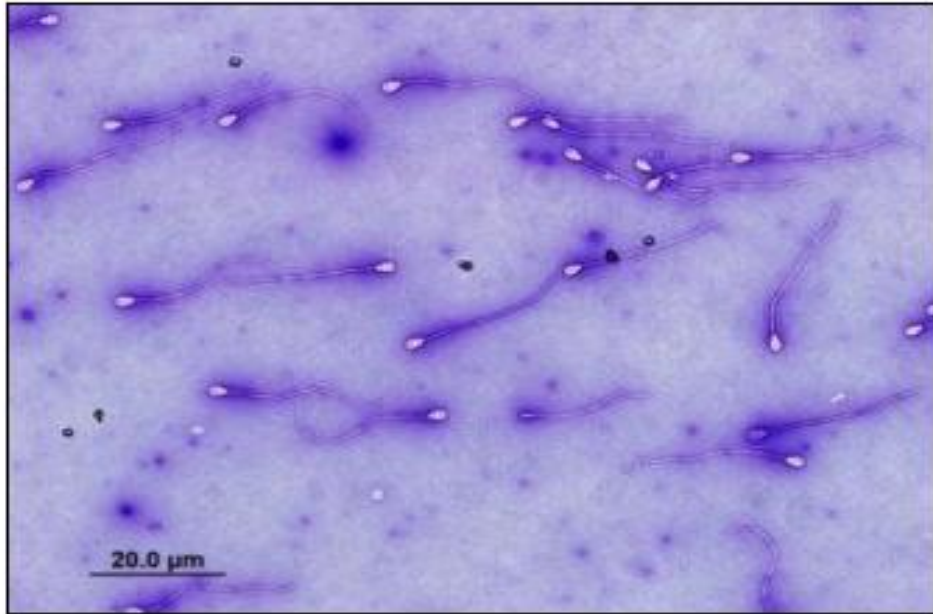


Figure n°10 : Spermatozoïdes colorés à l'éosine-bleu d'aniline. (FONTBONNE A., 1995).

3.2. LE SYSTÈME CASA (Competized Assisted Sperm Analysis):

3.2.1. Principe de la technique CASA :

Les systèmes d'analyse de la semence assistée par ordinateur ou CASA. Ce dernier permet d'obtenir de nombreux paramètres objectifs en évaluant un très grand nombre de spermatozoïdes en très peu de temps.

Le système Hamilton-Thorne a été validé pour son utilisation chez le chien par IGUEROUADA et VERSTEGEN (IGUER-OUADA et VERSTEGEN ; 2001). Il s'agit d'un analyseur d'images qui permet d'obtenir le pourcentage de spermatozoïdes mobiles, la vitesse moyenne, la vitesse de déplacement curvilinéaire, la vitesse de déplacement en ligne droite, la linéarité, l'amplitude et la fréquence du déplacement latéral de la tête, l'amplitude et la fréquence des battements flagellaires.

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.

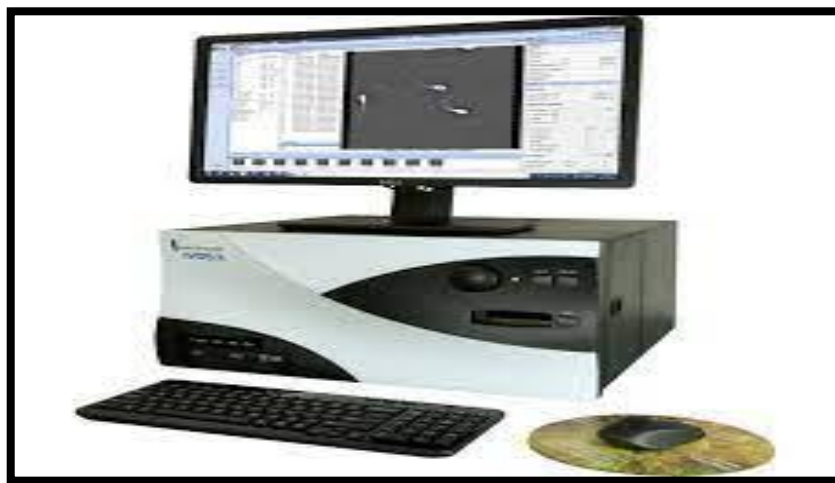


Figure 11: Hamilton-Thorne IVOS II. (PONTHER et al ; 2014).

Pour effectuer l'analyse, on place un échantillon de trois microlitres de sperme à l'aide d'une micropipette dans une cellule de Leja® (**figure 12**) qui contient quatre chambres comme celle présentée dans la photographie 5. 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.

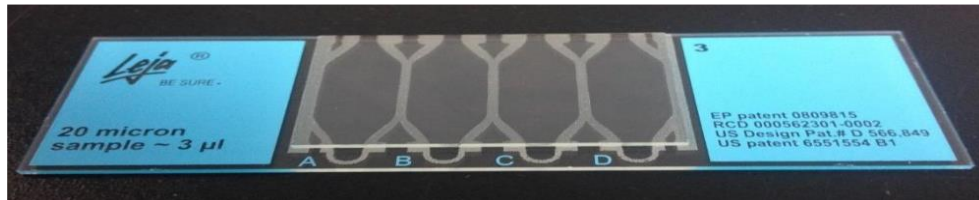


Figure 12 : Cellule de Leja® à quatre chambres (**PONTHIER et al ; 2014**).

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. Rijsselaere et al. Recommandent d'effectuer l'analyse d'une semence concentrée à cinquante millions de spermatozoïdes par millilitre, au grossissement x60 et d'analyser environ cent spermatozoïdes (**RIJSSELAERE et al ; 2004**).

3.2.2. Paramètres générés :

Il calcule plusieurs paramètres de mobilité à savoir :

- La motilité totale (TMOT) : ce paramètre représente le pourcentage des gamètes qui bougent indépendamment de leur qualité de mouvement par rapport à la population totale.
- Le pourcentage des spermatozoïdes progressifs (PMOT) : Ce paramètre inclut tous les spermatozoïdes ayant une VAP > 50 µm/seconde et une linéarité (VSL/VAP) supérieure à 75%.
- Le pourcentage des spermatozoïdes statiques : Il représente tous les spermatozoïdes qui ne bougent pas pendant l'analyse.
- les mouvements rapides, moyens et lents des spermatozoïdes (Speed, Medium et Slow).
- les différentes vitesses de progression :
- La "VCL" (Velocity Curvilinear) : Cette vitesse prend en considération la totalité de la distance (point par point) parcourue par le spermatozoïde pour un temps donné.

- La “VSL” (Velocity Straight line) : Cette vitesse prend en considération, pour un temps donné, les points de départ et d’arrivée du spermatozoïde, indépendamment de son trajet. **(LUVONI et al ; 2003).**
- La “VAP” (Velocity Average Pathway) : Cette vitesse correspond à la VCL, mais après lissage de son trajet.
- L’ALH (Amplitude of Lateral Head Displacement) : Ce paramètre correspond à la distance, en μm , balayée par la tête des spermatozoïdes durant le mouvement de battement.
- Le BCF (Beat Cross Frequency) : Il mesure en Hertz la fréquence de battement de la tête des spermatozoïdes en mouvement (Nombre de battement par unité de temps).
- Il s’agit d’une méthode d’analyse rapide qui permet d’analyser un grand nombre de spermatozoïdes en un bref temps. Cependant, ce test nécessite un appareillage coûteux réservé pour les centres spécialisés **(PENA MARTINEZ ; 2004) ; (BARIL et al ; 1993) ; (ALLIMANT M., 2010).**

Ainsi, les spermatozoïdes ayant déjà effectué leur capacitation sont reconnus car ils présentent une vitesse curvilinéaire et une amplitude du déplacement latéral de la tête augmentée ainsi qu’une linéarité diminuée. Cette méthode a donc l’avantage d’estimer plus précisément la mobilité d’un grand nombre de spermatozoïdes en un minimum de temps, et cela de façon assez simple, après un paramétrage minutieux. De plus, elle peut être utilisée sur de la semence fraîche mais également de la semence réfrigérée ou encore congelée/décongelée **(PENA MARTINEZ ; 2004) ; (BARIL et al ; 1993) ; (ALLIMANT M., 2010).**

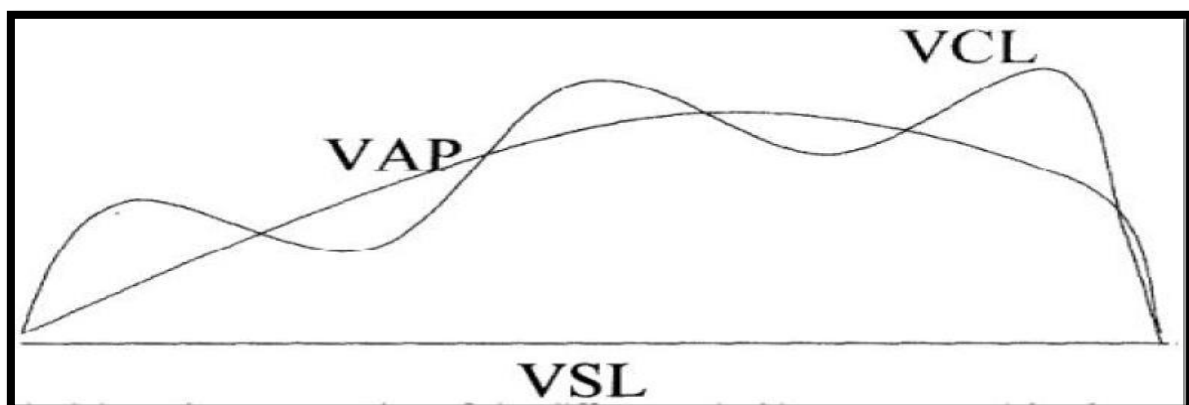


Figure 13 : représentation schématique de VAP, VCL et VSL **(PONTHIER et al ; 2014).**

1. MATERIELS ET METHODES :

1.1. Lieu de l'expérience :

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



Figure 14 : Plate-forme Biotechnologique en Reproduction des Carnivores/Université de Blida1.

1.2. Matériel biologique (animaux) :

Pour réaliser l'ensemble des expériences, nous avons utilisé la semence de 06 chiens appartenant soit à la Plateforme Biotechnologique en Reproduction des Carnivores (PBRC) soit à la DGSN. Nous avons prélevé 14 éjaculats à partir de six (06) chiens différents récoltés à 48 h d'intervalle minimal. Les chiens utilisés pour notre expérimentation sont : (**voir tableau n° IV**)

Tableau n° IV : Identification de chaque animal.

Non de chien	Race	Age
CHOPPER	Berger belge	6 ans
ASCKO	Berger belge	9 ans
FIDEL	Berger allemand	3 ans
TYRON	Berger belge	10 ans
3LUCKY	Berger allemand	13 ans
FAX	Berger allemand	10 ans



Figure n°15 : photos des chiens inclus dans la partie expérimentale

1.3. Matériel d'analyse :

1.3.1. Analyseur CASA (HT IVOS II).

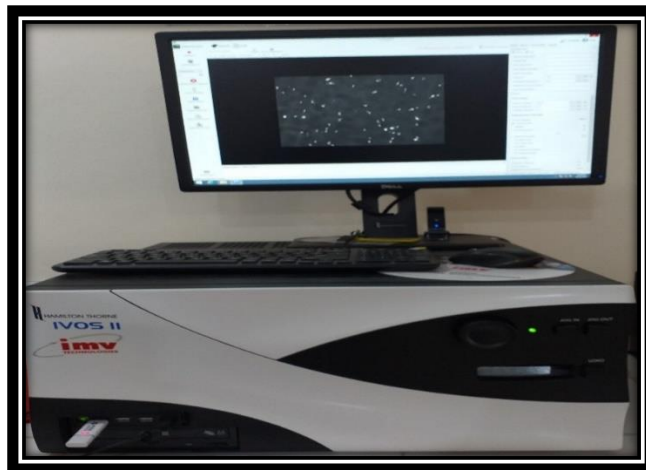


Figure 16: Hamilton-Thorne IVOS II.

1.3.2. Matériels de récolte:

- ✓ Etuve réglée à 37°C
- ✓ Cônes de récolte en silicone
- ✓ Gel lubrifiant aspermicide
- ✓ Tube en verre pyrex non gradué
- ✓ Tube à fond conique en verre pyrex gradué à 1/10^{ème} de ml.

- ✓ Bain marie réglé à 37°C

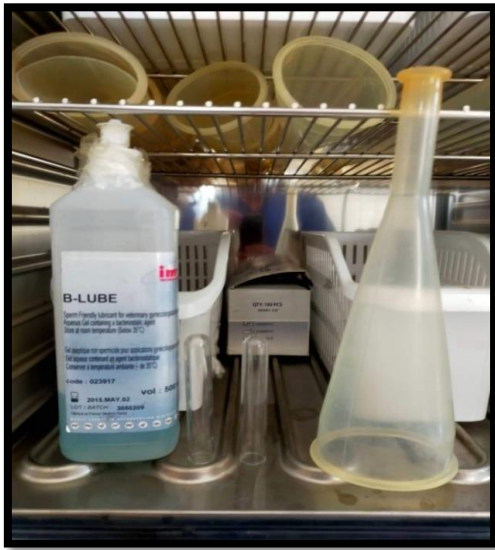


Figure n° 17 : matériels de récoltes. (Photo personnel).

1.3.3. Matériels de dilution :

- Milieu tampon phosphate saline souvent abrégé PBS, de l'anglais (phosphate-buffered saline) est une solution tampon couramment utilisée en biochimie.
- Milieu easy buffer (EB IMV Technologie) : milieu commercial.

1.4. Méthodes :

1.4.1. Récolte de la semence :

Éjaculats sont récoltés à partir de chiens à raison d'une récolte par chien à 2 jours d'intervalle minimum. La récolte est faite par stimulation manuelle et de façon fractionnée sur trois tubes (fraction pré-spermatique, spermatique et post-spermatique) au moyen d'un cône de récolte en silicone attaché à un tube de prélèvement en pyrex gradué (graduation de 0.1mL) en présence d'une chienne en chaleur. Les trois fractions sont évaluées, mais seulement la fraction riche en spermatozoïdes (deuxième) est utilisée.



Figure 18 : la récolte de sperme chez le chien.



Figure 19 : Les trois différentes fractions spermatiques recueillies chez le chien.



Figure 20 : Mettre les trois phases de l'éjaculat dans le bain-marie.

1.4.2. Evaluation initiale de la semence :

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

1.4.3. 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 MILOVANOV. (**Figure n°21**).

Tableau n° V : Echelle d'appréciation de la mobilité de masse de la semence canine, dérivée de l'échelle de MILOVANOV. (**MILOVANOV V.K., 1962**).

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

1.4.4. Mobilité individuelle :

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%). (**Figure n°21**)



Figure 21 : Dépôt d'une goutte de semence sur une lame pour évaluation.

1.4.5. Mesure de la concentration des spermatozoïdes :

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. . (**Figure n°25**)



Figure 22 : Le photomètre SDM1, Minitub.

1.5. Préparation des milieux : (Figure n°23 et n° 24)

1.5.1. PBS composition :

- Na Cl (chlorure de sodium).
- Na₂ H PO₄ (sodium phosphate dibasic dodecahydrate).
- Na H₂ PO₄ (sodium phosphate monobasic).
- Eau distillé.



Figure 23 : préparation du milieu PBS.

1.5.2. Easy Buffer (EBB) : milieu commerciale.



Figure 24 : milieu commercial Easy Buffer.

1.6. Dilution de la semence :

Les éjaculats issus de chacun des chiens récoltés (à intervalle de deux jour) sont dilués dans un bain marie à +37°C respectivement dans les deux dilueurs PBS et EBB. 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 25 millions de spermatozoïdes par millilitre selon la relation $C1 \times V1 = C2 \times V2$.

1.7. Protocole expérimental :

Dans cette étude, 14 éjaculats ont été récoltés à partir de 6 chiens (**Voir tableau n° IV**). Chaque éjaculat a été soumis à un contrôle de qualité initial en évaluant la mobilité massale, et individuelle ainsi que la concentration spermatique.

Chaque éjaculat remplissant les conditions d'inclusion dans l'étude est dilué comme décrit précédemment pour être analysé par le système HT-IVOS II.

La première analyse se fait directement à T0 pour les deux milieux, puis une analyse après chaque 10 mn d'incubation sera faite à T0+10mn, T0+20mn, T0+30mn, T0+40mn.

Les analyses des 14 éjaculats étudiés (n=14) pour les deux milieux à 5 temps d'incubation ont été enregistrées ce qui a permis l'obtention de **140 analyses HT-IVOS II**. (**Voir schéma annexes**)

1.8. Saisie des données :

Les données cinétique et morphométriques récupérées du système HT IVOS II ensuite saisies sur un tableau Excel qui comporte 17 colonnes aux nombres des paramètres et des facteurs étudiés, ainsi que 140 lignes représentant le nombre d'analyses IVOS II réalisés.

1.9. Analyse statistique :

Le logiciel IBM SPSS ainsi que le Microsoft Excel ont été utilisés pour réaliser les statistiques descriptives et la comparaison des moyennes par l'ANOVA (Analyse de la variance) et le GLM (modèle général linéaire).

En cas de présence de différence significative des tests POST-HOC de TUKEY et DUNCAN ont été utilisés pour comparer les différentes catégories entre elles. (**Voir annexes**).

2. RESULTATS :

2.1. Etudes de l'effet des milieux et temps d'incubation sur les paramètres cinétiques et morphométriques :

2.1.1. Pourcentages de mobilité :

2.1.1.1. Pourcentage des spermatozoïdes progressifs :

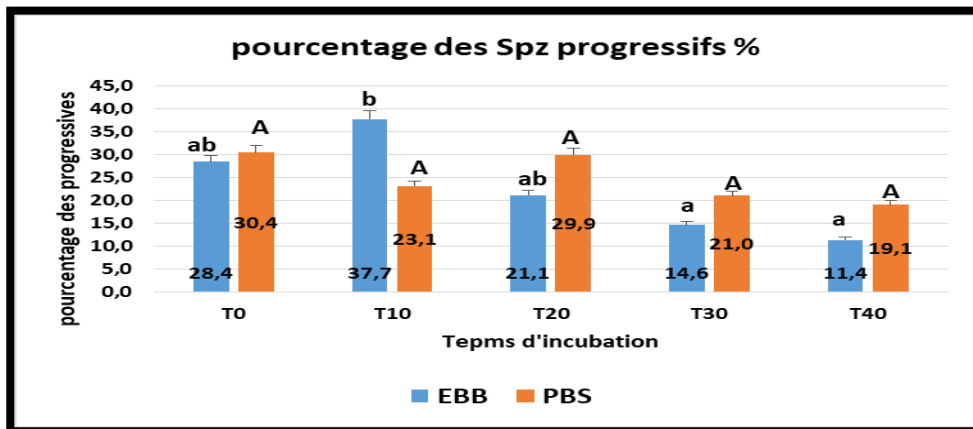


Figure n°25 : Effet du temps d'incubation « T » et milieux de dilution sur les SPZ progressifs évalué par le système HT-IVOS II.

- Les lettres « a, b, c » signifie une différence significative pour le milieu EBB.
- Les lettres « A, B, C » signifie une différence significative pour le milieu PBS.
- la différence est significative à $p < 0.05$.

Légende : PBS : solution saline tamponnée au phosphate, EB-B : Easy Buffer B ® (solution tampon commerciale).

Interprétation :

Ce graphe montre :

- Une différence significative entre les temps d'incubation (T=10 mn - T= 30mn) et (T= 10 mn - T=40) pour le milieu EBB étudiés dans l'évaluation de pourcentage des spermatozoïdes progressifs canins analysés à T0, T0+10mn, T0+20mn, T0+30mn et T0+40mn par le système HT-IVOS II.
- Une différence non significative entre les temps d'incubation pour le milieu PBS étudiés dans l'évaluation de pourcentage des spermatozoïdes progressifs canins analysés à T0, T0+10mn, T0+20mn, T0+30mn et T0+40mn par le système HT-IVOS II.

2.1.1.2. pourcentage des Spz mobiles % :

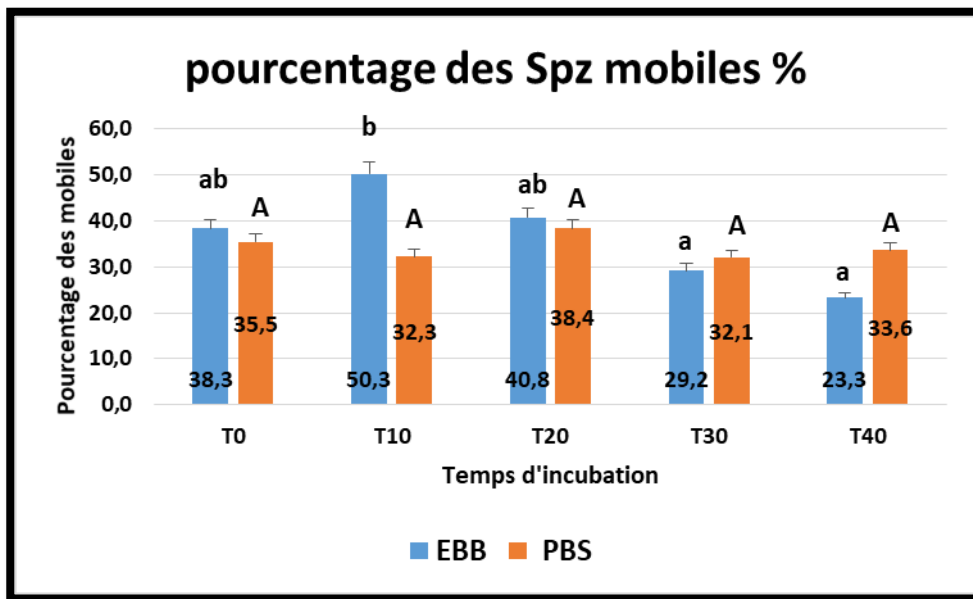


Figure n°26 : Effet du temps d'incubation « T » et milieux de dilution sur les SPZ mobiles évalué par le système HT-IVOS II.

- Les lettres « a, b, c » signifie une différence significative pour le milieu EBB.
- Les lettres « A, B, C » signifie une différence significative pour le milieu PBS.
- la différence est significative à $p < 0.05$.

Légende : PBS : solution saline tamponnée au phosphate, EB-B : Easy Buffer B ® (solution tampon commerciale).

Interprétation :

Ce graphe montre :

- Une différence significative entre les temps d'incubation (T=10 mn - T= 30mn) et (T= 10 mn - T=40) pour le milieu EBB étudiés dans l'évaluation de pourcentage des spermatozoïdes mobiles canins analysés à T0, T0+10mn, T0+20mn, T0+30mn et T0+40mn par le système HT-IVOS II.
- Une différence non significative entre les temps d'incubation pour le milieu PBS étudiés dans l'évaluation de pourcentage des spermatozoïdes mobiles canins analysés à T0, T0+10mn, T0+20mn, T0+30mn et T0+40mn par le système HT-IVOS II.

2.1.2. Les paramètres cinétiques :

2.1.2.1 Les vitesses :

* La vitesse curvilinéaire (VCL, μm^2) :

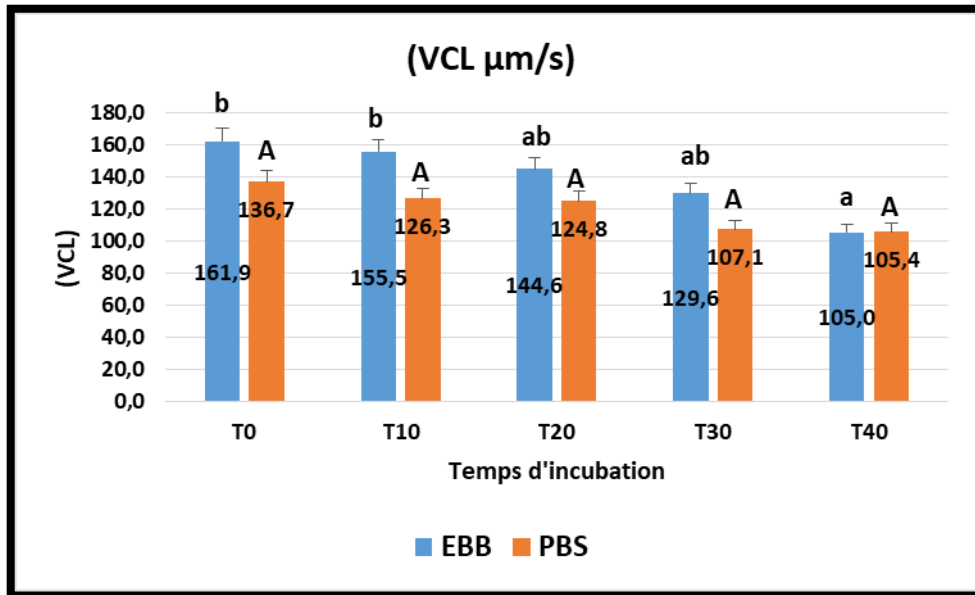


Figure n°27 : Effet du temps d'incubation « T » et milieux de dilution sur la VCL évalué par le système HT-IVOS II.

- Les lettres « a, b, c » signifie une différence significative pour le milieu EBB.
- Les lettres « A, B, C » signifie une différence significative pour le milieu PBS.
- la différence est significative à $p < 0.05$.

Légende : PBS : solution saline tamponnée au phosphate, EB-B : Easy Buffer B ® (solution tampon commerciale).

Interprétation :

Ce graphe montre :

- Une différence significative entre les temps d'incubation (T=0 mn - T= 40mn) et (T= 10 mn - T=40) pour le milieu EBB étudiés dans l'évaluation de la VCL analysé à T0, T0+10mn, T0+20mn, T0+30mn et T0+40mn par le système HT-IVOS II.
- Une différence non significative entre les temps d'incubation pour le milieu PBS étudiés dans l'évaluation de la VCL analysé à T0, T0+10mn, T0+20mn, T0+30mn et T0+40mn par le système HT-IVOS II.

* La vitesse moyenne (VAP, $\mu\text{m/s}$) :

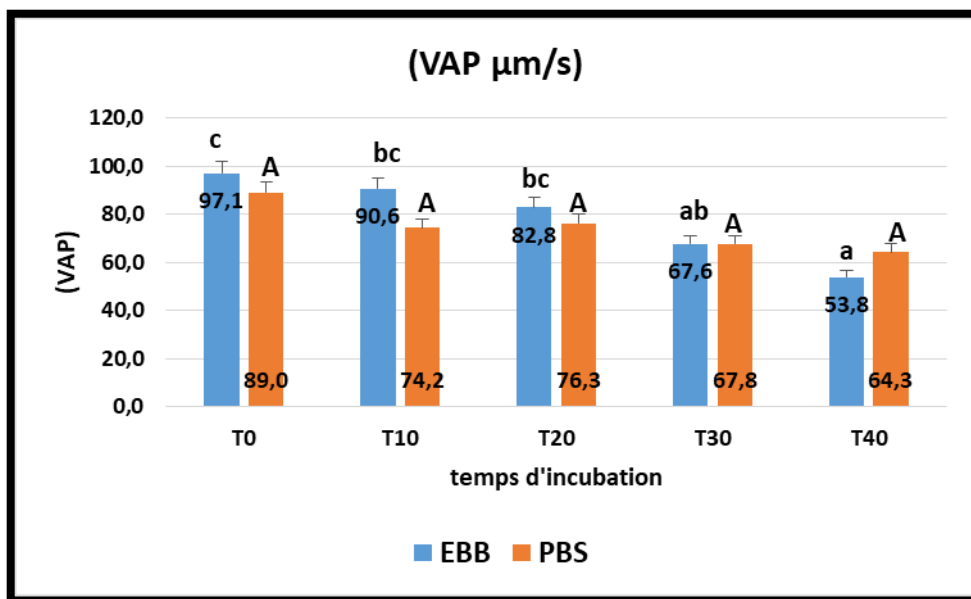


Figure n°28 : Effet du temps d'incubation « T » et milieux de dilution sur la VAP évalué par le système HT-IVOS II.

- Les lettres « a, b, c » signifie une différence significative pour le milieu EBB.
- Les lettres « A, B, C » signifie une différence significative pour le milieu PBS.
- la différence est significative à $p < 0.05$.

Légende : PBS : solution saline tamponnée au phosphate, EB-B : Easy Buffer B ® (solution tampon commerciale).

Interprétation :

Ce graphe montre :

- Une différence significative entre les temps d'incubation ($T=0$ mn - $T=30$ mn) et ($T=0$ mn - $T=40$) pour le milieu EBB étudiés dans l'évaluation de la VAP analysé à T_0 , T_0+10 mn, T_0+20 mn, T_0+30 mn et T_0+40 mn par le système HT-IVOS II.
- Une différence non significative entre les temps d'incubation pour le milieu PBS étudiés dans l'évaluation de la VAP à T_0 , T_0+10 mn, T_0+20 mn, T_0+30 mn et T_0+40 mn par le système HT-IVOS II.

* La vitesse en ligne droite (VSL, μm^2) :

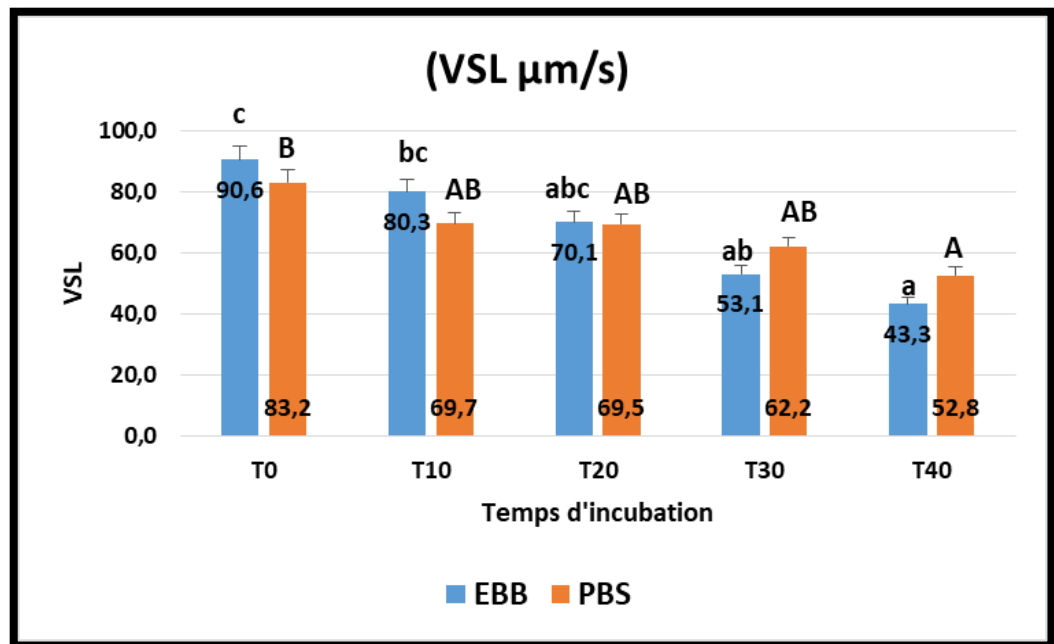


Figure n°29 : Effet du temps d'incubation « T » et milieux de dilution sur la VSL évalué par le système HT-IVOS II.

- Les lettres « a, b, c » signifie une différence significative pour le milieu EBB.
- Les lettres « A, B, C » signifie une différence significative pour le milieu PBS.
- la différence est significative à $p < 0.05$.

Légende : PBS : solution saline tamponnée au phosphate, EB-B : Easy Buffer B ® (solution tampon commerciale).

Interprétation :

Ce graphe montre :

- Une différence significative entre les temps d'incubation (T= 0mn - T= 30mn) et (T= 0mn - T= 40mn) pour le milieu EBB étudiés dans l'évaluation de la VSL analysé à T0, T0+10mn, T0+20mn, T0+30mn et T0+40mn par le système HT-IVOS II.
- Une différence significative entre les temps d'incubation (T= 0 mn – T= 40 mn) pour le milieu PBS étudiés dans l'évaluation de la VSL analysés à T0, T0+10mn, T0+20mn, T0+30mn et T0+40mn par le système HT-IVOS II.

2.1.2.2. Les orientations du mouvement et amplitude :

* La rectitude ou droiture (STR= VSL/VAP) :

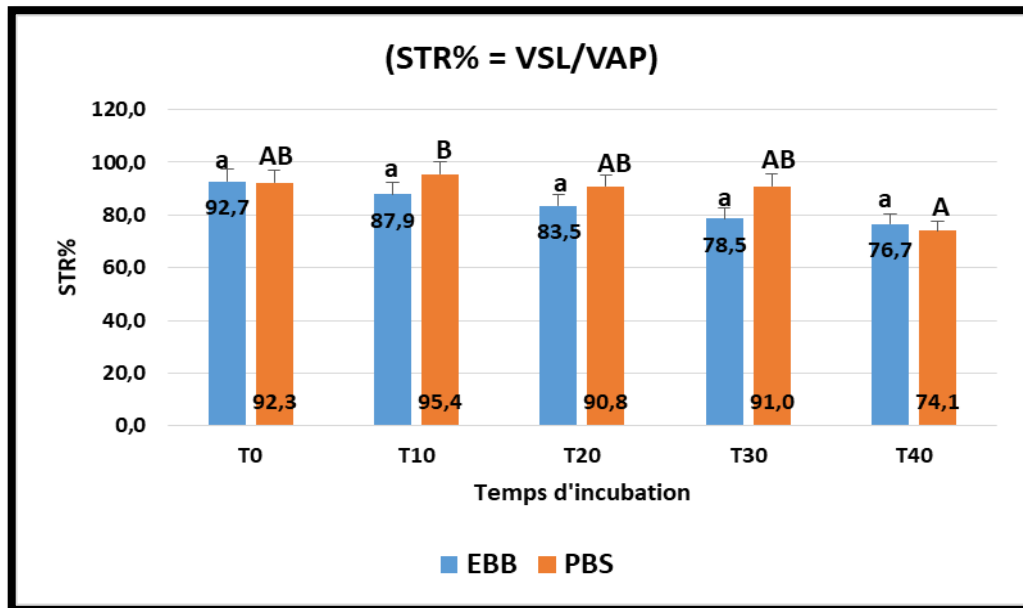


Figure n°30 : Effet du temps d'incubation « T » et milieux de dilution sur la STR évalué par le système HT-IVOS II.

- Les lettres « a, b, c » signifie une différence significative pour le milieu EBB.
- Les lettres « A, B, C » signifie une différence significative pour le milieu PBS.
- la différence est significative à $p < 0.05$.

Légende : PBS : solution saline tamponnée au phosphate, EB-B : Easy Buffer B ® (solution tampon commerciale).

Interprétation :

Ce graphe montre :

- Une différence non significative entre les temps d'incubation pour le milieu EBB étudiés dans l'évaluation de la STR analysé à T0, T0+10mn, T0+20mn, T0+30mn et T0+40mn par le système HT-IVOS II.
- Une différence significative entre les temps d'incubation (T=10mn - T= 40mn) pour le milieu PBS étudiés dans l'évaluation de la STR analysés à T0, T0+10mn, T0+20mn, T0+30mn et T0+40mn par le système HT-IVOS II.

* La linéarité (LIN = VSL/VCL) :

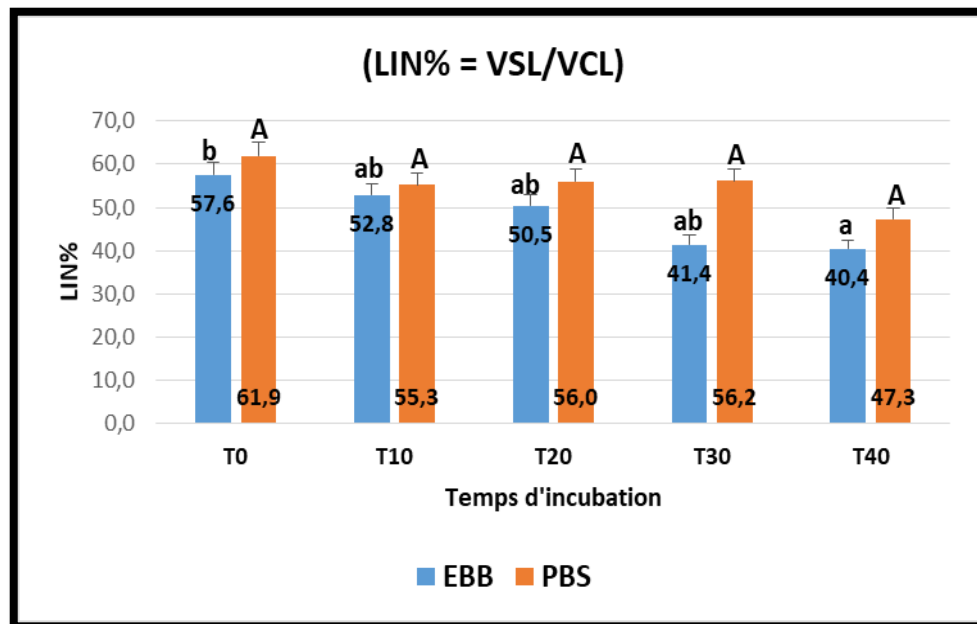


Figure n°31 : Effet du temps d'incubation « T » et milieux de dilution sur la LIN évalué par le système HT-IVOS II.

- Les lettres « a, b, c » signifie une différence significative pour le milieu EBB.
- Les lettres « A, B, C » signifie une différence significative pour le milieu PBS.
- la différence est significative à $p < 0.05$.

Légende : PBS : solution saline tamponnée au phosphate, EB-B : Easy Buffer B ® (solution tampon commerciale).

Interprétation :

Ce graphe montre :

- Une différence significative entre les temps d'incubation (T=0 mn -T=40 mn) pour le milieu EBB étudiés dans l'évaluation de la LIN analysé à T0, T0+10mn, T0+20mn, T0+30mn et T0+40mn par le système HT-IVOS II.
- Une différence non significative entre les temps d'incubation pour le milieu PBS étudiés dans l'évaluation de la LIN analysés à T0, T0+10mn, T0+20mn, T0+30mn et T0+40mn par le système HT-IVOS II.

* L'Oscillation ($WOB \% = VAP/VCL$) :

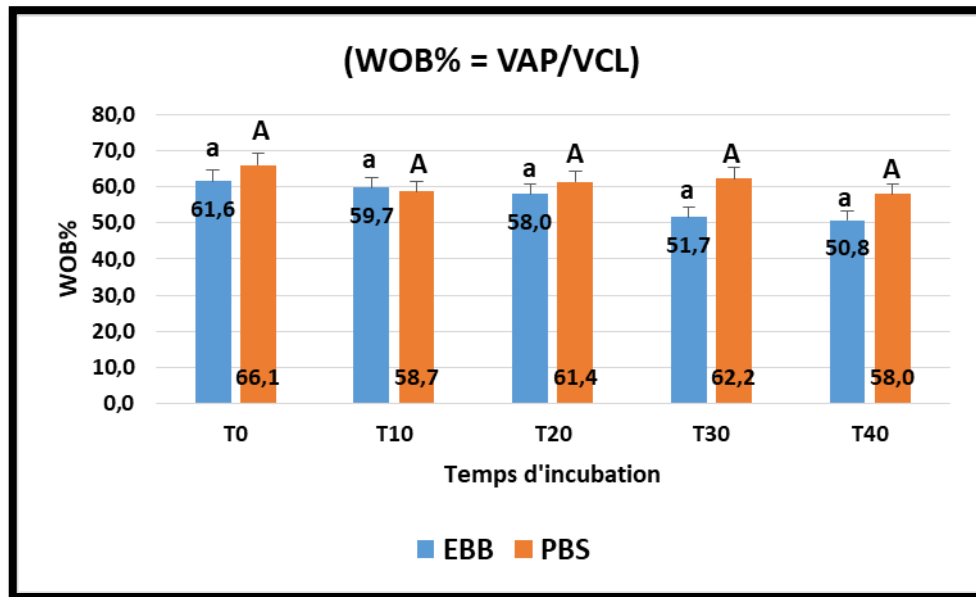


Figure n°32 : Effet du temps d'incubation « T » et milieux de dilution sur le WOB évalué par le système HT-IVOS II.

- Les lettres « a, b, c » signifie une différence significative pour le milieu EBB.
- Les lettres « A, B, C » signifie une différence significative pour le milieu PBS.
- la différence est significative à $p < 0.05$.

Légende : PBS : solution saline tamponnée au phosphate, EB-B : Easy Buffer B ® (solution tampon commerciale).

Interprétation :

Ce graphe montre :

- Une différence non significative entre les temps d'incubation pour le milieu EBB étudiés dans l'évaluation du WOB analysé à T0, T0+10mn, T0+20mn, T0+30mn et T0+40mn par le système HT-IVOS II.
- Une différence non significative entre les temps d'incubation pour le milieu PBS étudiés dans l'évaluation du WOB analysés à T0, T0+10mn, T0+20mn, T0+30mn et T0+40mn par le système HT-IVOS II.

2.1.2.3. Paramètres de mouvement de la tête et du flagelle :

* Le mouvement latéral de la tête (ALH μm) :

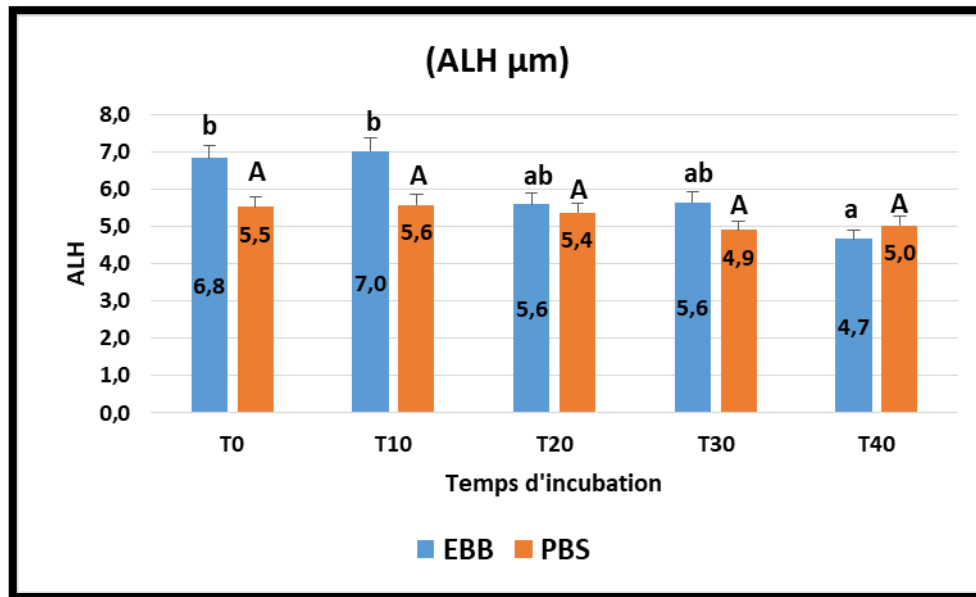


Figure n°33 : Effet du temps d'incubation « T » et milieux de dilution sur l'ALH évalué par le système HT-IVOS II.

- Les lettres « a, b, c » signifie une différence significative pour le milieu EBB.
- Les lettres « A, B, C » signifie une différence significative pour le milieu PBS.
- la différence est significative à $p < 0.05$.

Légende : PBS : solution saline tamponnée au phosphate, EB-B : Easy Buffer B ® (solution tampon commerciale).

Interprétation :

Ce graphe montre :

- Une différence non significative entre les temps d'incubation (T=0mn-T=40mn) et (T=10 mn – T= 40 mn) pour le milieu EBB étudiés dans l'évaluation d'ALH analysé à T0, T0+10mn, T0+20mn, T0+30mn et T0+40mn par le système HT-IVOS II.
- Une différence non significative entre les temps d'incubation pour le milieu PBS étudiés dans l'évaluation d'ALH analysés à T0, T0+10mn, T0+20mn, T0+30mn et T0+40mn par le système HT-IVOS II.

* Le battement du flagelle (BCF, Hz) :

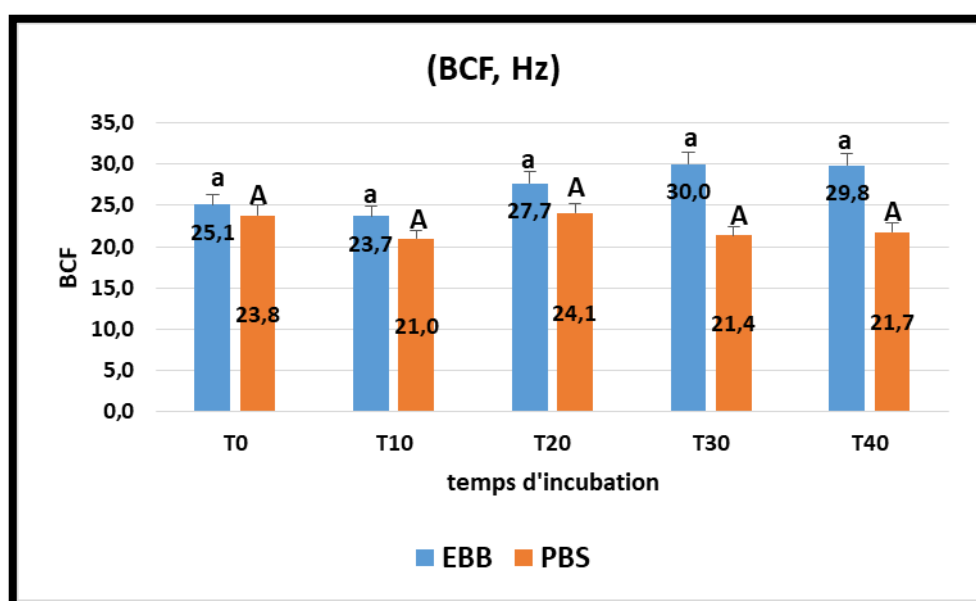


Figure n°34 : Effet du temps d'incubation « T » et milieux de dilution sur la BCF évalué par le système HT-IVOS II.

- Les lettres « a, b, c » signifie une différence significative pour le milieu EBB.
- Les lettres « A, B, C » signifie une différence significative pour le milieu PBS.
- la différence est significative à $p < 0.05$.

Légende : PBS : solution saline tamponnée au phosphate, EB-B : Easy Buffer B ® (solution tampon commerciale).

Interprétation :

Ce graphe montre :

- Une différence non significative entre les temps d'incubation pour le milieu EBB étudiés dans l'évaluation du BCF analysé à T0, T0+10mn, T0+20mn, T0+30mn et T0+40mn par le système HT-IVOS II.
- Une différence non significative entre les temps d'incubation pour le milieu PBS étudiés dans l'évaluation du BCF analysés à T0, T0+10mn, T0+20mn, T0+30mn et T0+40mn par le système HT-IVOS II.

2.1.3. Les paramètre morphométriques :

2.1.3.1. Le pourcentage des Spz normaux(le taux de normozoospermie) (%) :

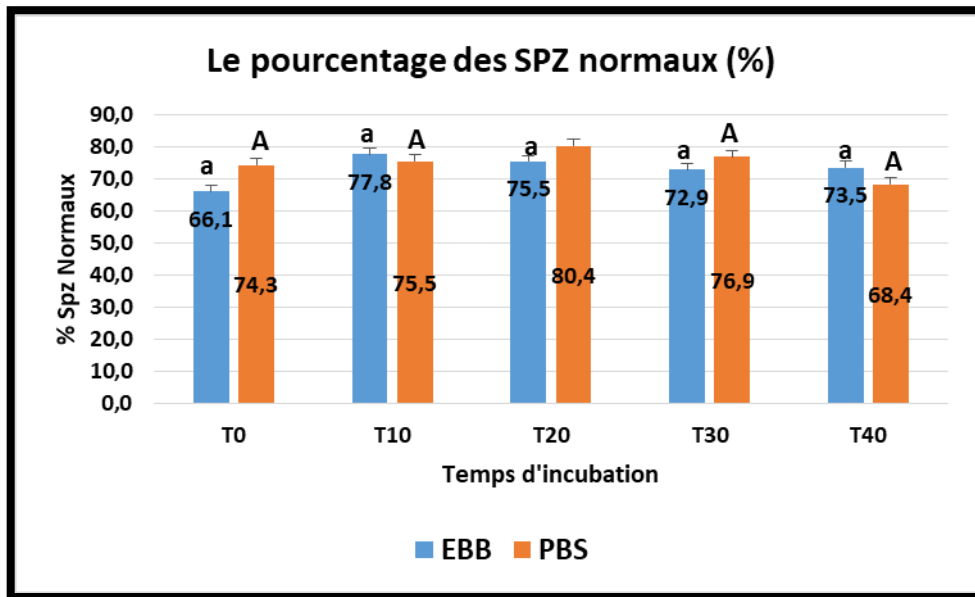


Figure n°35 : Effet du temps d'incubation « T » et milieux de dilution sur le pourcentage des Spz normaux évalué par le système HT-IVOS II.

- Les lettres « a, b, c » signifie une différence significative pour le milieu EBB.
- Les lettres « A, B, C » signifie une différence significative pour le milieu PBS.
- la différence est significative à $p < 0.05$.

Légende : PBS : solution saline tamponnée au phosphate, EB-B : Easy Buffer B ® (solution tampon commerciale).

Interprétation :

Ce graphe montre :

- Une différence non significative entre les temps d'incubation pour le milieu EBB étudiés dans l'évaluation du pourcentage des Spz normaux analysé à T0, T0+10mn, T0+20mn, T0+30mn et T0+40mn par le système HT-IVOS II.
- Une différence non significative entre les temps d'incubation pour le milieu PBS étudiés dans l'évaluation du pourcentage des Spz normaux analysés à T0, T0+10mn, T0+20mn, T0+30mn et T0+40mn par le système HT-IVOS II.

2.1.3.2. Le pourcentage des anomalies ou Tératozoospermie :

* Le flagelle courbé (Bent Tail, %) :

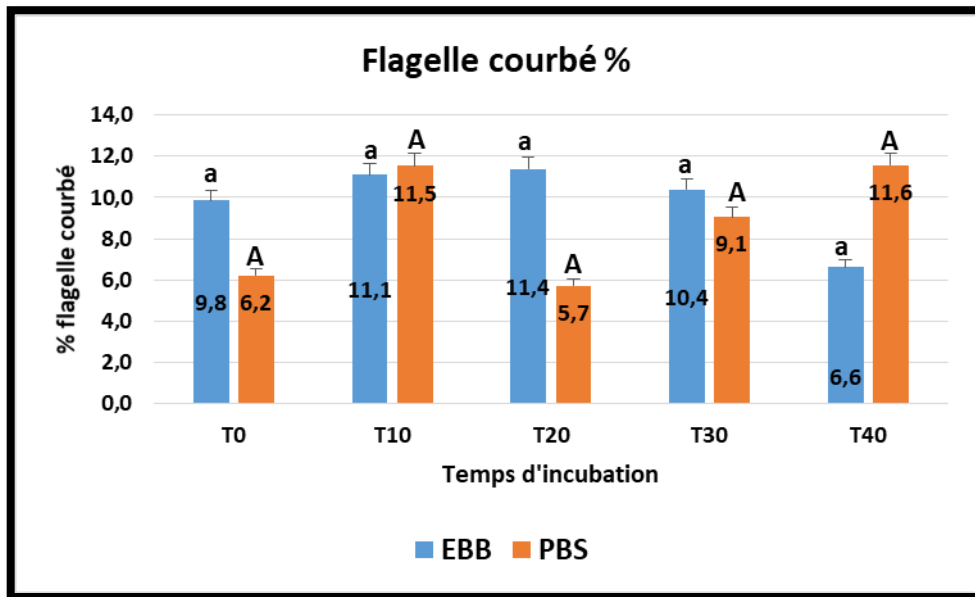


Figure n°36 : Effet du temps d'incubation « T » et milieux de dilution sur le pourcentage des flagelles courbés évalué par le système HT-IVOS II.

- Les lettres « a, b, c » signifie une différence significative pour le milieu EBB.
- Les lettres « A, B, C » signifie une différence significative pour le milieu PBS.
- la différence est significative à $p < 0.05$.

Légende : PBS : solution saline tamponnée au phosphate, EB-B : Easy Buffer B ® (solution tampon commerciale).

Interprétation :

Ce graphe montre :

- Une différence non significative entre les temps d'incubation pour le milieu EBB étudiés dans l'évaluation du pourcentage des flagelles courbés analysé à T0, T0+10mn, T0+20mn, T0+30mn et T0+40mn par le système HT-IVOS II.
- Une différence non significative entre les temps d'incubation pour le milieu PBS étudiés dans l'évaluation du pourcentage des flagelles courbés analysés à T0, T0+10mn, T0+20mn, T0+30mn et T0+40mn par le système HT-IVOS II.

*** Le flagelle enroulé ou spiralé (Coiled Tail, %) :**

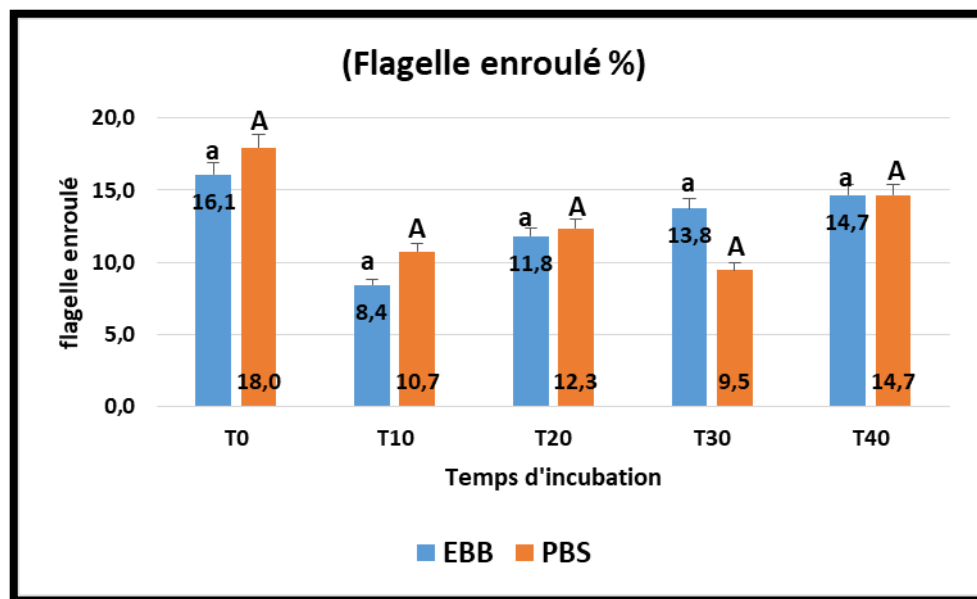


Figure n°37 : Effet du temps d'incubation « T » et milieux de dilution sur le pourcentage des flagelles enroulés évalué par le système HT-IVOS II.

- Les lettres « a, b, c » signifie une différence significative pour le milieu EBB.
- Les lettres « A, B, C » signifie une différence significative pour le milieu PBS.
- la différence est significative à $p < 0.05$.

Légende : PBS : solution saline tamponnée au phosphate, EB-B : Easy Buffer B ® (solution tampon commerciale).

Interprétation :

Ce graphe montre :

- Une différence non significative entre les temps d'incubation pour le milieu EBB étudiés dans l'évaluation du pourcentage des flagelles enroulés analysés à T0, T0+10mn, T0+20mn, T0+30mn et T0+40mn par le système HT-IVOS II.
- Une différence non significative entre les temps d'incubation pour le milieu PBS étudiés dans l'évaluation du pourcentage des flagelles enroulés analysés à T0, T0+10mn, T0+20mn, T0+30mn et T0+40mn par le système HT-IVOS II.

*** La gouttelette distale (Distal Droplet %) :**

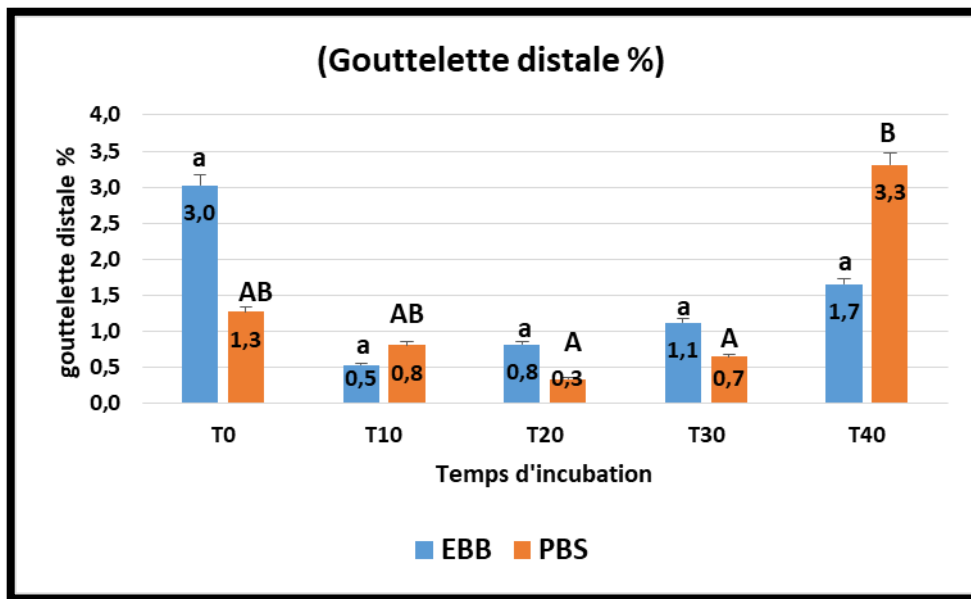


Figure n°38 : Effet du temps d'incubation « T » et milieux de dilution sur le pourcentage des gouttelettes distales évalué par le système HT-IVOS II.

- Les lettres « a, b, c » signifie une différence significative pour le milieu EBB.
- Les lettres « A, B, C » signifie une différence significative pour le milieu PBS.
- la différence est significative à $p < 0.05$.

Légende : PBS : solution saline tamponnée au phosphate, EB-B : Easy Buffer B ® (solution tampon commerciale).

Interprétation :

Ce graphe montre :

- Une différence non significative entre les temps d'incubation pour le milieu EBB étudiés dans l'évaluation du pourcentage des gouttelettes distales analysé à T0, T0+10mn, T0+20mn, T0+30mn et T0+40mn par le système HT-IVOS II.
- Une différence significative entre les temps d'incubation (T=20 mn- T=40 mn) et (T=30 mn – T=40 mn) pour le milieu PBS étudiés dans l'évaluation du pourcentage des gouttelettes distales analysés à T0, T0+10mn, T0+20mn, T0+30mn et T0+40mn par le système HT-IVOS II.

*** La gouttelette proximale (Proximal Droplet %) :**

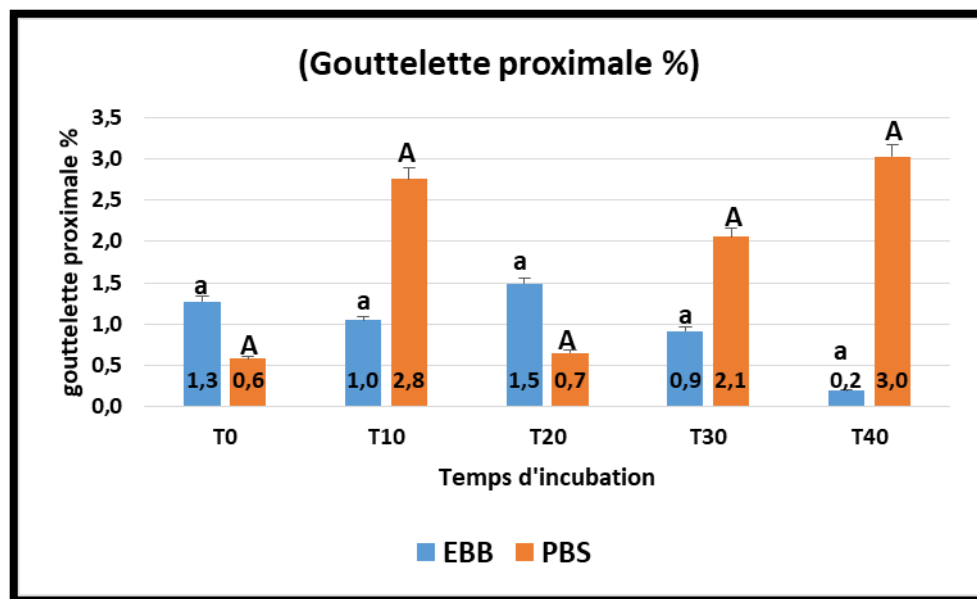


Figure n°39 : Effet du temps d'incubation « T » et milieux de dilution sur le pourcentage des gouttelettes proximales évalué par le système HT-IVOS II.

- Les lettres « a, b, c » signifie une différence significative pour le milieu EBB.
- Les lettres « A, B, C » signifie une différence significative pour le milieu PBS.
- la différence est significative à $p < 0.05$.

Légende : PBS : solution saline tamponnée au phosphate, EB-B : Easy Buffer B ® (solution tampon commerciale).

Interprétation :

Ce graphe montre :

- Une différence non significative entre les temps d'incubation pour le milieu EBB étudiés dans l'évaluation du pourcentage des gouttelettes proximales analysé à T0, T0+10mn, T0+20mn, T0+30mn et T0+40mn par le système HT-IVOS II.
- Une différence non significative entre les temps d'incubation pour le milieu PBS étudiés dans l'évaluation du pourcentage des gouttelettes proximales analysés à T0, T0+10mn, T0+20mn, T0+30mn et T0+40mn par le système HT-IVOS II.

*** Réflexion distal de la pièce intermédiaire (DMR %) :**

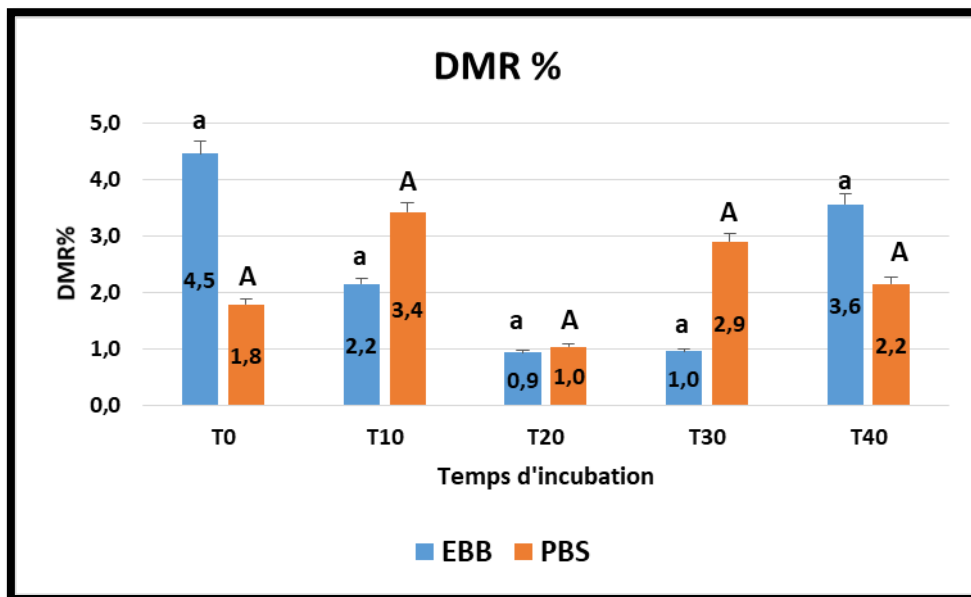


Figure n°40 : Effet du temps d'incubation « T » et milieux de dilution sur le pourcentage des DMR évalué par le système HT-IVOS II.

- Les lettres « a, b, c » signifie une différence significative pour le milieu EBB.
- Les lettres « A, B, C » signifie une différence significative pour le milieu PBS.
- la différence est significative à $p < 0.0.5$.

Légende : PBS : solution saline tamponnée au phosphate, EB-B : Easy Buffer B ® (solution tampon commerciale).

Interprétation :

Ce graphe montre :

- Une différence non significative entre les temps d'incubation pour le milieu EBB étudiés dans l'évaluation du pourcentage de DMR analysé à T0, T0+10mn, T0+20mn, T0+30mn et T0+40mn par le système HT-IVOS II.
- Une différence non significative entre les temps d'incubation pour le milieu PBS étudiés dans l'évaluation du pourcentage de DMR analysés à T0, T0+10mn, T0+20mn, T0+30mn et T0+40mn par le système HT-IVOS II.

3. DISCUSSION

L'analyseur CASA permet d'évaluer la mobilité des spermatozoïdes avec une grande objectivité comparée à l'œil humain il mesure aussi la concentration et la morphologie spermatique au même temps que la mobilité avec un temps moyen par analyse de quelques secondes, ce qui représente un grand intérêt dans le cadre d'un centre de reproduction canine (**IGUER-OUADA et VERSTEGEN, 2001**).

Cependant, le système CASA souffre également de quelques limites techniques influençant ses résultats et qui sont attribuables à plusieurs facteurs pré-analytiques tenant aux erreurs humaines de manipulation et de préparation de la semence, mais aussi à d'autres facteurs liés aux conditions d'analyse CASA tel que le choix de la chambre d'analyse, sa profondeur, la température et la concentration d'analyse, la solution de dilution utilisée et la durée d'incubation de la semence avant analyse.

Les milieux de dilution et le temps d'incubation à 37°C avant analyse soulèvent une problématique pratique dans l'utilisation quotidienne du système CASA que ce soit pour la recherche ou la clinique. Il s'agit du choix de la solution de dilution et du temps d'incubation à 37°C avant analyse. (**IGUER-OUADA et VERSTEGEN, 2001**).

En effet, beaucoup de laboratoire utilisent **les solutions tampon** commerciales pour la dilution spermatique ce qui représente un coût supplémentaire de l'analyse notamment avec la cherté de ces solutions qui de plus ne se conservent pas bien et se contaminent après rupture de l'emballage « données non publiées ». Il serait judicieux d'évaluer l'efficacité d'une solution tampon basique synthétisée au laboratoire tel que le PBS comme alternative aux tampons commerciaux.

Pour le temps d'incubation avant analyse, la durée recommandée par le fabricant et rapportés par beaucoup d'auteurs est de 10mn à 37°C. Cependant, dans certaines situations expérimentales qui requièrent l'analyse d'un nombre important d'échantillons ou d'aliquotes du même échantillon notamment dans les études qui croisent plusieurs facteurs (factoriel élevé), le temps d'incubation s'étend à plus de 10min « données non publiées ». Il serait donc judicieux d'évaluer l'effet de plusieurs temps d'incubation supérieurs à 10min et étudier leurs effets sur les paramètres analysés.

Dans la présente étude on a remarqué que :

L'effet des deux milieux étudiés et les cinq temps d'incubation n'a pas altéré les qualités des paramètres de mobilité (Spz Mobiles, Spz progressifs), à T= 10 mn et T= 20 mn où les pourcentages des paramètres était meilleurs ; tandis que à T0, T= 30 mn et T= 40 mn on a remarqué une diminution de 10% de qualité des spermatozoïdes mobiles et progressifs par rapport à T10 et T20 surtout pour le milieu EB-B. Ceci peut être expliqué par :

- A T0 par l'effet de changement brusque de milieu pour les spermatozoïdes, bien que le milieu soit incubé à 37°C avant dilution, donc les Spz n'ont pas le temps idéal d'adaptation avec le nouveau milieu pour cela la littérature impose un temps de 10 mn d'incubation avant analyse, notamment pour le contrôle de qualité.
- A T30 et T40 par les effets de changement de pH du milieu et l'osmolarité qui peuvent être altérer par le temps de conservation après préparation pour les PBS et le temps d'ouverture du flacon pour le milieu commercial EBB. Ça peut être dû aussi à l'effet de recristallisation du composant tampon du milieu.
- La baisse de qualité peut être aussi due à des contaminations bactériennes et l'épuisement de la réserve énergétique du Spz, parce qu'à la différence des milieux de conservation, les milieux de dilution ne contiennent pas de source d'énergie comme le glucose.

L'effet des deux milieux étudiés et les cinq temps d'incubation n'a pas altéré les qualités des paramètres de vélocité (VCL, VAP et VSL), et les paramètres d'orientation du mouvement et amplitude (STR, LIN, WOB et ALH) à T= 10 mn et T= 20 mn où les pourcentages des paramètres était meilleurs ; tandis que à T0, T= 30 mn et T= 40 mn on a remarqué une diminution de qualité due aux mêmes causes citées pour les paramètres de mobilités.

Pour les paramètres de morphologies (Pourcentage des Spz normaux, DMR, Gouttelette distale, Gouttelette Proximale, flagelle courbé et flagelle enroulé), ont a marqué que les deux milieux et les cinq temps d'incubation n'ont pas modifiés la forme des Spz, sauf pour la Gouttelette distale ou on a marqué une augmentation du pourcentage des Spz avec une Gouttelette distale a T40 due à l'effet d'osmolarité du milieu.

Pour le temps T0, on a noté que le Spz n'a pas pu exprimer ces qualités directement après dilution, donc il est préférable de mettre la semence diluée en incubation pendant 10 mn et ne pas procéder à l'analyse directement pour donner le temps aux Spz de s'adapter au milieu de dilution.

L'absence de différence significative entre les deux temps (T10 et T20) étudiés, par rapport à la totalité des paramètres cinétiques et morphométriques démontre que dans les laboratoires d'analyse de semence où on a beaucoup de paramètres à étudier, on peut y aller jusqu'à 20 mn d'incubation avant analyse sans altération des résultats ce qui représente un intérêt pour les laboratoires d'analyse spermatique à activité intensive, tel que les centres d'insémination et de contrôle de qualité qui sont appelés à analyser un nombre important d'échantillons à la fois et où le temps d'attente peut excéder les 10 mn d'incubation recommander.

Cependant au-delà de 20 mn d'incubation (T30 et T40), on a remarqué une baisse de qualité des paramètres cinétiques et morphométriques, et ceci peut être expliqué d'un côté par l'effet du changement de l'osmolarité et le pH des milieux et de l'autre côté par absence de source d'énergie et surtout de molécule de stabilisation membranaire qui sont à base de phospholipides destinées à réparer la bicouche membranaire du Spz altéré par les changements de condition physicochimique et éventuellement thermique auxquels sont exposés les Spz.

Par ailleurs nous soulignons la supériorité du milieu PBS par rapport au milieu EBB à T30 qui a conservé le pourcentage des Spz progressifs à 21 % à partir d'un pourcentage de 30,4 % à T0 alors que l'EBB n'a pu préserver que 14,6 % de mobilité progressive à partir de 28,4 % à T0 (**voir figure n° 25**).

Pour le T40 qui a conservé le pourcentage des Spz progressifs à 21 % à partir d'un pourcentage de 30,4 % à T0 alors que l'EBB n'a pu préserver que 14,6 % de mobilité progressive à partir de 28,4 % à T0 (**voir figure n° 25**).

Changement de morphométrie par rapport au temps d'incubation : pour les paramètres morphométriques sont restés inchangés dans tous les temps d'incubation pour les deux milieux étudiés, ceci signifie que l'incubation à 37 °C et la composition des deux milieux n'a pas interféré avec la normozoospermie, cependant la seule différence significative concerne la Gouttelette distale dans le milieu PBS qui a augmenté d'une valeur de 1,3 % à T0 à une valeur de 3,3 %, à T40. Cette anomalie exprime un changement morphologique du Spz induit par entre autre d'une baisse de la pression osmotique du milieu. En effet une incubation de 40 mn à 37°C pourrait avoir influé sur l'osmolarité du milieu.

Nos observations pendant le travail expérimental nous ont permis d'émettre l'hypothèse que la solution PBS perd son efficacité avec le temps à cause d'une recristallisation des sels conduisant à une chute de l'osmolarité et éventuellement une variation du pH.

L'absence de différence significative entre les deux milieux étudiés par rapport à la totalité des paramètres cinétiques et morphométriques démontre que le PBS est une bonne alternative à la solution commerciale EB-B. Ceci représente un grand intérêt financier pour le laboratoire d'analyse spermatique, étant donné que le PBS est simple de préparation et moins coûteux que la solution commerciale EB-B. Cependant, cette dernière garde l'avantage de conservabilité prolongée à la différence du PBS préparé au laboratoire.

CONCLUSION ET RECOMMANDATION

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

- L'analyse spermatique par HT-IVOS II immédiate après récolte sans incubation préalable (T0), a montré une baisse des pourcentages de mobilité (Mobiles, Progressifs) et des paramètres cinétiques par rapport à l'analyse après 10 mn d'incubation à 37 °C, ce temps d'incubation semble permettre aux Spz de s'adapter au milieu de dilution et constitue le meilleur temps d'incubation dans notre étude.
- L'incubation à 37 °C des spermatozoïdes canins pendant 20 mn n'a montré aucune différence significative par rapport à T0 + 10 mn. Les Spz ont conservé leur mobilité (Mobiles, Progressifs), paramètres cinétique et morphométriques de façon similaire au temps de référence. Il représente ainsi une bonne alternative pour les laboratoires d'analyse spermatique et les centres de reproduction canine à activité intensive.
- Les temps d'incubation T0+30 mn et T0+40 mn ont montré une différence hautement significative par rapport à T0 et T0+10 mn. Les pourcentages de mobilités total et progressif et les paramètres de cinétiques ont chuté considérablement montrons ainsi que ces durés (30mn et 40 mn) sont inadaptés à l'incubation des Spz canins avant analyse par le système HT-IVOS II.
- Le milieu de dilution PBS a permis aux Spz canins de préserver la totalité des paramètres (mobilité, cinétiques et morphométriques) analysés par HT-IVOS II, de façon similaire et sans aucune différence significative de la solution de dilution commerciale EB-B largement utilisée dans les laboratoires d'analyse spermatique animale. Le PBS constitue donc une bonne alternative à la solution EB-B. Ceci représente un grand intérêt financier pour le laboratoire d'analyse spermatique, étant donné que le PBS est simple de préparation et moins coûteux que la solution commerciale EB-B. Cependant, cette dernière garde l'avantage de conservabilité prolongée à la différence du PBS préparé au laboratoire.

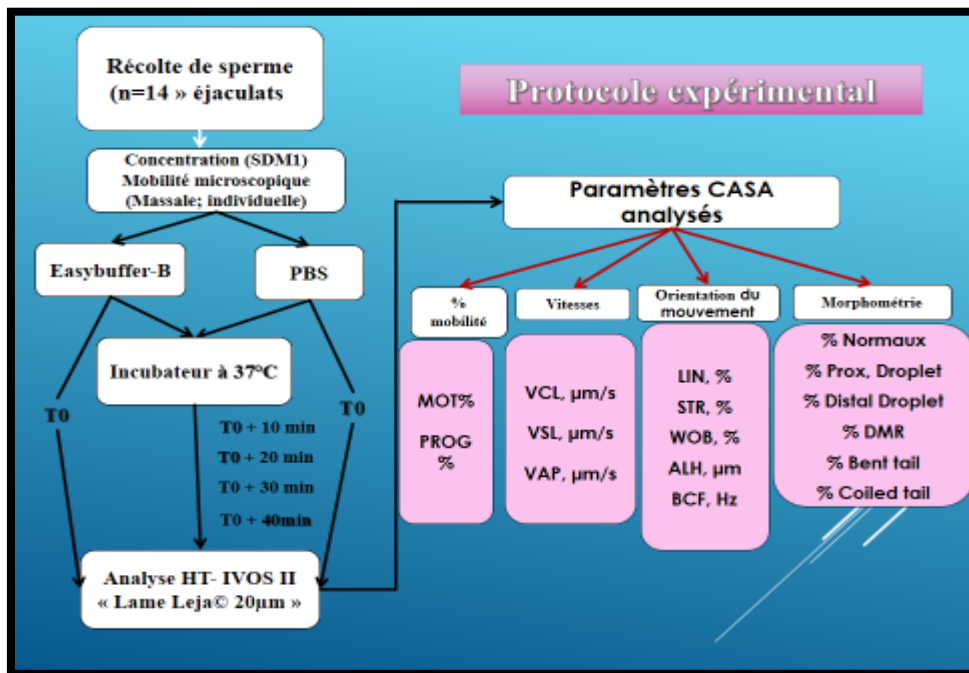
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ALLIMANT M. (2010) Actualités sur les méthodes d'évaluation de la qualité de la semence de l'étalon. Thèse de doctorat vétérinaire, Université Claude- Bernard, Lyon, 138p.
- BARIL, G., CHEMINEAU, P., COGNIE, Y., GUÉRIN, Y., LEBOEUF, B., ORGEUR, P., VALLET J.C. (1993). Manuel de formation pour l'insémination artificielle chez les ovins et les caprins. Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture. FAO, Rome, Italy, 125P
- BARONE R. (1978) Anatomie comparée des mammifères domestiques. Tome 3. Splanchnologie. Fascicule 2. Appareil uro-génital, fœtus et ses annexes, péritoine et topographie abdominale. Première édition. Vigot, Paris, 951 pp.
- BEDFORD J.M., CROSS N.L. (1998) Sperm Capacitation. In: Knobil E., Neill J.D. (eds.). Encyclopedia of reproduction. Volume 4. Academic press, San Diego, 597-602.
- COLE H.H, CUPPS P.T. (1959) Reproduction in domestic animals. First edition. Volume 2. Academic press, New York, 451 pp.
- COLLIN B. (2003) Anatomie du chien. Edition Derouaux Ordina, Liège, 562 pp.
- EILTS B.E. (2005) Theoretical aspects of canine cryopreserved semen evaluation. Theriogenology, 64, 685-691.
- ENGLAND G.C.W. (1999) Semen quality in dogs and the influence of a short-interval second ejaculation. Theriogenology, 52, 981-986.
- ENGLAND G.C.W., PLUMMER J.M. (1993) Hypo-osmotic swelling of dog spermatozoa. J. Reprod. Fert. Suppl., 47, 261-270.
- 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.
- 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.
- FONTBONNE A. (1995) Infécondité du chien mâle. In : Encyclopédie vétérinaire. Pathologie de la reproduction. Elsevier, 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., 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., DUMONT C. (1992) Prélèvement et examen de la semence chez le chien. In : Pages J.P. (eds.). *Les indispensables de l'animal de compagnie. Reproduction du chien et du chat*. PMCAC Edition, Paris, 251-260.
- FONTBONNE A., DUMONT C. (1992) Prélèvement et examen de la semence chez le chien. In : Pages J.P. (eds.). *Les indispensables de l'animal de compagnie. Reproduction du chien et du chat*. PMCAC Edition, Paris, 251-260.
- FRESHMAN J.L. (2002) Semen collection and evaluation. *Clin. Tech. Small Anim. Pract.*, 17, 3, 104-107.
- GUERIN V. (1997) Contribution à l'évaluation du pouvoir fécondant du sperme de chien. Emploi d'un colorant de l'acrosome : le Spermac®. Thèse de doctorat vétérinaire, Université Claude-Bernard, Lyon, 95 pp.
- IGUER-OUADA M. et VERSTEGEN J. (2001) Evaluation of the « Hamilton Thorn computer-based automated system » for dog semen analysis. *Theriogenology*, 55, 733-749.
- JEYENDRAN R.S., VAN DER VEN H.H., PEREZ-PELAEZ M., CRABO B.G., ZANEVELD L.J.D. (1984) Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J. Repro Fert.*, 70, 219-225.
- JOHNSTON S.D., ROOT KUSTRITZ M.V., OLSON P.N.S. (2001a) Sexual differentiation and normal anatomy of the dog. In: Johnston S.D. (eds.). *Canine and feline Theriogenology*. W.B. Saunders Compagny, Philadelphia, 275-286.
- JOHNSTON S.D., ROOT KUSTRITZ M.V., OLSON P.N.S. (2001b) Semen Collection, Evaluation, and Preservation. In: Johnston S.D. (eds.). *Canine and feline Theriogenology*. W.B. Saunders Compagny, Philadelphia, 287- 306.
- KUMI-DIAKA J. (1993) Subjecting canine semen to the hypo-osmotic test. *Theriogenology*, 39, 6, 1279-1289.
- KUTZLER M.A. (2005) Semen collection in the dog. *Theriogenology*, 64, 747-754.
- LE MOIGNE A. et FOUCRIER J. (2009). *Biologie du développement*. 7ème Edition. DUNOD Inc : 200 p.
- LUVONI G.C., KALCHSCHMIDT E., LEONI S. et RUGGIERO C. (2003)

- MANDON M. (2015). Isolement des cellules basales épидидymaire et caractérisation de nouvelles fonctions. Thèse de doctorat à Université du Québec, Institut national de la recherche scientifique : 232p.
- MILLETTE C.F. (1998) Spermatozoa. In: Knobil E., Neill J.D. (eds.). Encyclopedia of reproduction. Volume 4. Academic press, San Diego, 586-596.
- MILOVANOV V.K., “The biology of reproduction and the artificial insemination of animals”, Seljhozgiz, Moscow, (1962), 969p.
- OETTLE E.E. (1993) Sperm morphology and fertility in the dog. J. Reprod. Fert. Suppl., 47, 257-260.
- PENA A.I., BARRIO M., BECERRA J.J., QUINTELA L.A., HERRADON P.G. (2007) Infertility in a dog due to proximal cytoplasmic droplets in the ejaculate: investigation of the significance for sperm functionality in vitro. Reprod. Dom. Anim., 42, 471-478.
- PENA MARTINEZ A.I. (2004) Canine fresh and cryopreserved semen evaluation. Anim. Reprod. Sci., 82-83, 209-224.
- PONTHER, 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) Semen. In: Knobil E., Neill J.D. (eds.) Encyclopedia of reproduction. Volume 4. Academic press, San Diego, 360-367.
- REECE W.O. (1997) Male reproduction. In: Reece W.O. (Eds.). Physiology of domestic animals. Second edition. Williams and Wilkins Compagny, Baltimore, 344-365.
- RIJSSELAERE T., VAN SOOM A., MAES D., VERBERCKMOES S., DE KRUIF A. (2004) Effect of blood admixture on in vitro survival of chilled and frozen-thawed canine spermatozoa. Theriogenology, 61, 1589-1602.
- RODRIGUEZ- GIL J.E., MONTSERRAT A., RIGAU T. (1994) Effects of hypoosmotic incubation on acrosome and tail structure on canine spermatozoa. Theriogenology, 42, 815-829.
- RODRIGUEZ-MARTINEZ H., EKWALL H., LINDE-FORSBERG C. (1993) Fine structure and elemental composition of fresh and frozen dog spermatozoa. J. Reprod. Fert. Suppl., 47, 279-285.
- SCHATTEN G. (1998) Fertilization. In: Knobil E., Neill J.P. (eds.). Encyclopedia of reproduction. Volume 2. Academic press, San Diego, 256-265.

Schéma du Protocole expérimental :



Fiche analyse CASA :

Animal species: Animal ID: EJ01T0EBB Genetic Line: Ejaculate number: Batch number: Analysis Date: 4/19/2022 8:13:42	University of Blida 1 / ALGERIA Carnivore Reproductive Biotechnologies Platform Quality Control Report 			
Motility				
	Count	Sample M	Concentration M/ml	Percent Of Total
Total	35	4	5.10	100
Static	20	2	2.91	57.10
Progressive	14	2	2.04	40
Motile	15	2	2.19	42.90
Stow	1	0	0.15	2.90
Morph				
	Count	Sample M	Concentration M/ml	Percent Of Total
Bent Tail	4	0	0.58	11.40
Coiled Tail	4	0	0.58	11.40
DMR	0	0	0.00	0.00
Distal Droplet	0	0	0.00	0.00
Proximal Droplet	2	0	0.29	5.70
Normal Fraction:			74.30	%
Kinematics				
VCL Curvilinear velocity (µm/s):	154.97	LIN % :	64.31	
VAP Average path velocity(µm/s):	107.90	WOB % :	69.39	
VSL Straightline velocity (µm/s):	100.55	ALH (µm):	5.57	
STR % :	90.46	BCF (Hz) :	25.29	
PO BOX 270 Soumaa road 09000 Blida-Algeria. Phone/fax : +21325.27.24.21 Cell : +213661721940. Email : crbp@univ-blida.dz				

Tableaux des statistiques descriptives pour chaque paramètre étudié :

Descriptives									
PROG.EBB									
	N	Moyenne	Ecart type	Erreur standard	Intervalle de confiance à 95 % pour la moyenne		Minimum	Maximum	Variance intercomposantes
					Borne inférieure	Borne supérieure			
0	14	28,4000	14,39973	3,84849	20,0858	36,7142	7,70	50,30	
1	14	37,7214	24,49471	6,54649	23,5786	51,8643	,00	80,30	
2	14	21,1357	12,43590	3,32364	13,9554	28,3160	,00	42,90	
3	14	14,6214	12,51204	3,34398	7,3972	21,8457	,00	36,40	
4	14	11,3500	13,86843	3,70649	3,3426	19,3574	,00	48,70	
Total	70	22,6457	18,41807	2,20138	18,2541	27,0373	,00	80,30	
Modèle	Effets fixes		16,19185	1,93530	18,7807	26,5108			
	Effets aléatoires			4,76787	9,4080	35,8834			94,93600

Descriptives									
PROG.PBS									
	N	Moyenne	Ecart type	Erreur standard	Intervalle de confiance à 95 % pour la moyenne		Minimum	Maximum	Variance intercomposantes
					Borne inférieure	Borne supérieure			
0	14	30,4357	26,05853	6,96444	15,3900	45,4815	8,30	77,30	
1	14	23,0571	19,67883	5,25939	11,6949	34,4194	,00	64,70	
2	14	29,9143	24,75573	6,61625	15,6208	44,2078	5,90	76,00	
3	14	21,0000	18,92963	5,05916	10,0704	31,9296	,00	62,50	
4	14	19,0500	16,99329	4,54165	9,2384	28,8616	,00	59,00	
Total	70	24,6914	21,45398	2,56424	19,5759	29,8069	,00	77,30	
Modèle	Effets fixes		21,56966	2,57807	19,5427	29,8402			
	Effets aléatoires			2,57807 ^a	17,5336 ^a	31,8493 ^a			-6,13260

Descriptives

MOT.EBB

		N	Moyenne	Ecart type	Erreur standard	Intervalle de confiance à 95 % pour la moyenne		Minimum	Maximum	Variance intercomposantes
						Borne inférieure	Borne supérieure			
0		14	38,3357	17,73691	4,74039	28,0947	48,5767	12,50	75,00	
1		14	50,2714	27,35120	7,30992	34,4793	66,0635	12,50	86,50	
2		14	40,7714	14,82184	3,96130	32,2136	49,3293	20,00	68,80	
3		14	29,2286	14,70491	3,93005	20,7382	37,7189	10,00	61,50	
4		14	23,2929	17,97098	4,80295	12,9167	33,6690	1,20	67,90	
Total		70	36,3800	20,78855	2,48471	31,4231	41,3369	1,20	86,50	
Modèle	Effets fixes			19,08698	2,28133	31,8239	40,9361			
	Effets aléatoires				4,68240	23,3796	49,3804			83,60203

Descriptives

MOT.PBS

		N	Moyenne	Ecart type	Erreur standard	Intervalle de confiance à 95 % pour la moyenne		Minimum	Maximum	Variance intercomposantes
						Borne inférieure	Borne supérieure			
0		14	35,4714	25,06068	6,69775	21,0018	49,9410	8,30	79,50	
1		14	32,2714	17,57439	4,69695	22,1243	42,4186	11,80	68,60	
2		14	38,4071	24,58966	6,57186	24,2095	52,6048	5,90	81,00	
3		14	32,0500	22,29228	5,95786	19,1788	44,9212	3,40	67,90	
4		14	33,6286	23,47065	6,27280	20,0770	47,1801	,00	80,00	
Total		70	34,3657	22,21490	2,65519	29,0688	39,6627	,00	81,00	
Modèle	Effets fixes			22,75682	2,71996	28,9336	39,7979			
	Effets aléatoires				2,71996 ^a	26,8139 ^a	41,9175 ^a			-30,02901

Descriptives									
VCL.EBB									
	N	Moyenne	Ecart type	Erreur standard	Intervalle de confiance à 95 % pour la moyenne		Minimum	Maximum	Variance intercomposantes
					Borne inférieure	Borne supérieure			
0	14	161,8650	44,73524	11,95600	136,0356	187,6944	84,09	243,09	
1	14	155,4550	36,12984	9,65610	134,5943	176,3157	68,03	199,12	
2	14	144,6414	42,11993	11,25702	120,3221	168,9608	55,03	197,60	
3	14	129,6021	42,77684	11,43259	104,9035	154,3008	60,61	196,08	
4	14	105,0371	27,17445	7,26268	89,3471	120,7272	51,79	156,57	
Total	70	139,3201	43,13286	5,15536	129,0355	149,6048	51,79	243,09	
Modèle	Effets fixes		39,11267	4,67486	129,9838	148,6565			
	Effets aléatoires			10,16534	111,0966	167,5437			407,39948

Descriptives									
VCL.PBS									
	N	Moyenne	Ecart type	Erreur standard	Intervalle de confiance à 95 % pour la moyenne		Minimum	Maximum	Variance intercomposantes
					Borne inférieure	Borne supérieure			
0	14	136,6614	39,65659	10,59867	113,7644	159,5585	68,88	199,49	
1	14	126,3236	34,49210	9,21840	106,4084	146,2387	52,15	175,35	
2	14	124,8064	32,18330	8,60135	106,2243	143,3885	74,36	195,64	
3	14	107,1493	27,48282	7,34509	91,2812	123,0174	36,11	143,01	
4	14	105,3964	48,72545	13,02243	77,2632	133,5297	,00	165,72	
Total	70	120,0674	38,09327	4,55302	110,9844	129,1504	,00	199,49	
Modèle	Effets fixes		37,22255	4,44895	111,1823	128,9526			
	Effets aléatoires			5,99614	103,4195	136,7154			80,80317

Descriptives

VAP.EBB

	N	Moyenne	Ecart type	Erreur standard	Intervalle de confiance à 95 % pour la moyenne		Minimum	Maximum	Variance intercomposantes
					Borne inférieure	Borne supérieure			
					0	14			
1	14	90,5736	26,37975	7,05028	75,3424	105,8048	37,37	126,86	
2	14	82,7600	32,63232	8,72135	63,9187	101,6013	24,01	145,30	
3	14	67,6171	27,51828	7,35457	51,7286	83,5057	20,66	109,06	
4	14	53,7807	21,67628	5,79323	41,2652	66,2962	20,66	84,84	
Total	70	78,3706	30,44699	3,63911	71,1107	85,6304	20,66	147,31	
Modèle	Effets fixes		26,77637	3,20039	71,9790	84,7622			
	Effets aléatoires			7,87424	56,5082	100,2330			258,80563

Descriptives

VAP.PBS

	N	Moyenne	Ecart type	Erreur standard	Intervalle de confiance à 95 % pour la moyenne		Minimum	Maximum	Variance intercomposantes
					Borne inférieure	Borne supérieure			
					0	14			
1	14	74,2093	27,05299	7,23022	58,5894	89,8292	26,03	126,68	
2	14	76,3186	27,51052	7,35249	60,4345	92,2027	41,21	142,35	
3	14	67,7514	26,46475	7,07300	52,4711	83,0317	20,38	119,49	
4	14	64,3236	35,11809	9,38570	44,0470	84,6002	,00	130,47	
Total	70	74,3207	28,99903	3,46605	67,4061	81,2353	,00	142,35	
Modèle	Effets fixes		28,54111	3,41132	67,5078	81,1336			
	Effets aléatoires			4,25796	62,4987	86,1427			32,46581

Descriptives									
VSL.EBB									
	N	Moyenne	Ecart type	Erreur standard	Intervalle de confiance à 95 % pour la moyenne		Mini mum	Maximum	Variance intercomposantes
					Borne inférieure	Borne supérieure			
0	14	90,5771	21,67822	5,79375	78,0605	103,0938	38,76	141,46	
1	14	80,2600	30,09954	8,04444	62,8810	97,6390	23,49	125,59	
2	14	70,0993	32,07798	8,57320	51,5780	88,6206	11,47	140,18	
3	14	53,1236	22,61954	6,04533	40,0634	66,1837	14,14	84,18	
4	14	43,3057	21,84730	5,83894	30,6915	55,9200	14,14	78,07	
Total	70	67,4731	30,70163	3,66955	60,1526	74,7937	11,47	141,46	
Modèle	Effets fixes		26,05330	3,11397	61,2541	73,6922			
	Effets aléatoires			8,64341	43,4752	91,4711			325,05860

Descriptives									
VSL.PBS									
	N	Moyenne	Ecart type	Erreur standard	Intervalle de confiance à 95 % pour la moyenne		Minimum	Maximum	Variance intercomposantes
					Borne inférieure	Borne supérieure			
0	14	83,1636	25,33668	6,77151	68,5346	97,7925	52,39	137,99	
1	14	69,7271	27,24040	7,28030	53,9990	85,4553	21,68	122,06	
2	14	69,5450	28,39957	7,59011	53,1476	85,9424	34,76	137,50	
3	14	62,1664	28,22778	7,54419	45,8682	78,4647	14,21	120,13	
4	14	52,7750	29,89451	7,98964	35,5144	70,0356	,00	126,16	
Total	70	67,4754	28,85490	3,44882	60,5952	74,3556	,00	137,99	
Modèle	Effets fixes		27,86041	3,32996	60,8250	74,1258			
	Effets aléatoires			4,99880	53,5965	81,3543			69,49679

Descriptives									
STR.EBB									
	N	Moyenne	Ecart type	Erreur standard	Intervalle de confiance à 95 % pour la moyenne		Minimum	Maximum	Variance intercomposantes
					Borne inférieure	Borne supérieure			
0	14	92,6664	13,90827	3,71714	84,6360	100,6968	74,31	134,05	
1	14	87,9450	13,81021	3,69093	79,9712	95,9188	63,38	107,74	
2	14	83,5464	20,36732	5,44340	71,7867	95,3062	52,51	126,74	
3	14	78,5421	14,92341	3,98845	69,9256	87,1587	52,66	107,57	
4	14	76,6857	13,15130	3,51483	69,0924	84,2790	50,05	100,87	
Total	70	83,8771	16,13697	1,92874	80,0294	87,7249	50,05	134,05	
Modèle	Effets fixes		15,45739	1,84751	80,1874	87,5669			
	Effets aléatoires			2,95032	75,6858	92,0685			26,45532

Descriptives									
STR.PBS									
	N	Moyenne	Ecart type	Erreur standard	Intervalle de confiance à 95 % pour la moyenne		Minimum	Maximum	Variance intercomposantes
					Borne inférieure	Borne supérieure			
0	14	92,2921	5,82151	1,55586	88,9309	95,6534	82,08	101,24	
1	14	95,4029	25,43047	6,79658	80,7197	110,0860	70,12	177,72	
2	14	90,7657	11,45796	3,06227	84,1501	97,3813	71,18	115,84	
3	14	90,9879	12,94075	3,45856	83,5161	98,4596	69,75	117,49	
4	14	74,1157	27,06315	7,23293	58,4899	89,7415	,00	95,80	
Total	70	88,7129	19,47624	2,32786	84,0689	93,3568	,00	177,72	
Modèle	Effets fixes		18,50276	2,21150	84,2962	93,1295			
	Effets aléatoires			3,74188	78,3237	99,1020			45,55473

Descriptives									
LIN.EBB									
	N	Moyenne	Ecart type	Erreur standard	Intervalle de confiance à 95 % pour la moyenne		Minimum	Maximum	Variance intercomposant es
					Borne inférieure	Borne supérieure			
0	14	57,5907	12,89530	3,44641	50,1452	65,0362	36,38	80,88	
1	14	52,8471	15,85101	4,23636	43,6950	61,9992	26,46	75,65	
2	14	50,4514	20,55697	5,49408	38,5822	62,3207	16,22	89,01	
3	14	41,4293	14,04013	3,75238	33,3228	49,5358	17,75	66,22	
4	14	40,3986	16,59728	4,43581	30,8156	49,9816	17,75	72,58	
Total	70	48,5434	17,09266	2,04296	44,4678	52,6190	16,22	89,01	
Modèle	Effets fixes		16,20325	1,93666	44,6757	52,4112			
	Effets aléatoires			3,32389	39,3148	57,7720			36,48814

Descriptives									
LIN.PBS									
	N	Moyenne	Ecart type	Erreur standard	Intervalle de confiance à 95 % pour la moyenne		Minimum	Maximum	Variance intercomposantes
					Borne inférieure	Borne supérieure			
0	14	61,8943	13,71467	3,66540	53,9757	69,8129	38,24	83,29	
1	14	55,2793	14,94751	3,99489	46,6489	63,9097	30,62	72,40	
2	14	55,9579	14,64247	3,91336	47,5035	64,4122	39,33	84,23	
3	14	56,1693	16,17772	4,32368	46,8286	65,5100	38,72	84,08	
4	14	47,3471	22,17042	5,92529	34,5463	60,1480	,00	82,52	
Total	70	55,3296	16,78510	2,00620	51,3273	59,3318	,00	84,23	
Modèle	Effets fixes		16,60824	1,98506	51,3651	59,2940			
	Effets aléatoires			2,32290	48,8802	61,7790			7,27685

Descriptives

WOB.EBB

		N	Moyenne	Ecart type	Erreur standard	Intervalle de confiance à 95 % pour la moyenne		Minimum	Maximum	Variance intercomposantes
						Borne inférieure	Borne supérieure			
0		14	61,6064	9,08441	2,42791	56,3612	66,8516	46,11	74,02	
1		14	59,7464	11,22505	3,00002	53,2653	66,2276	39,61	74,74	
2		14	57,9843	15,96322	4,26635	48,7674	67,2012	28,73	92,22	
3		14	51,6879	11,83648	3,16343	44,8537	58,5220	25,93	72,77	
4		14	50,8364	14,66510	3,91941	42,3690	59,3038	25,93	78,87	
Total		70	56,3723	13,16359	1,57335	53,2335	59,5110	25,93	92,22	
Mo dèle	Effets fixes			12,79469	1,52926	53,3181	59,4264			
	Effets aléatoires				2,16759	50,3541	62,3905			11,79916

Descriptives

WOB.PBS

		N	Moyenne	Ecart type	Erreur standard	Intervalle de confiance à 95 % pour la moyenne		Minimum	Maximum	Variance intercomposantes
						Borne inférieure	Borne supérieure			
0		14	66,0836	11,86690	3,17156	59,2318	72,9353	44,02	83,15	
1		14	58,7250	13,32800	3,56206	51,0296	66,4204	34,14	75,23	
2		14	61,4436	11,92862	3,18806	54,5562	68,3310	50,15	86,01	
3		14	62,2443	13,15518	3,51587	54,6487	69,8399	40,40	85,00	
4		14	58,0064	21,98603	5,87601	45,3121	70,7008	,00	85,81	
Total		70	61,3006	14,79393	1,76821	57,7731	64,8281	,00	86,01	
Modèle	Effets fixes			14,94788	1,78661	57,7325	64,8687			
	Effets aléatoires				1,78661 ^a	56,3401 ^a	66,2610 ^a			-5,64166

Descriptives									
ALH.EBB									
	N	Moyenne	Ecart type	Erreur standard	Intervalle de confiance à 95 % pour la moyenne		Minimum	Maximum	Variance intercomposantes
					Borne inférieure	Borne supérieure			
0	14	6,8329	2,48704	,66469	5,3969	8,2688	2,53	10,75	
1	14	7,0207	1,80804	,48322	5,9768	8,0646	3,55	9,22	
2	14	5,6029	1,73256	,46305	4,6025	6,6032	2,11	9,37	
3	14	5,6493	1,65125	,44132	4,6959	6,6027	2,19	8,25	
4	14	4,6629	1,16402	,31110	3,9908	5,3349	2,41	6,67	
Total	70	5,9537	1,97117	,23560	5,4837	6,4237	2,11	10,75	
Modèle	Effets fixes		1,81867	,21737	5,5196	6,3878			
	Effets aléatoires			,43552	4,7445	7,1629			,71211

Descriptives									
ALH.PBS									
	N	Moyenne	Ecart type	Erreur standard	Intervalle de confiance à 95 % pour la moyenne		Minimum	Maximum	Variance intercomposantes
					Borne inférieure	Borne supérieure			
0	14	5,5343	2,41221	,64469	4,1415	6,9271	1,81	12,05	
1	14	5,5871	1,72916	,46214	4,5888	6,5855	3,27	8,78	
2	14	5,3664	1,49868	,40054	4,5011	6,2317	2,35	7,74	
3	14	4,9129	1,68762	,45104	3,9385	5,8873	2,15	7,81	
4	14	5,0236	2,40496	,64275	3,6350	6,4122	,00	8,54	
Total	70	5,2849	1,94513	,23249	4,8211	5,7487	,00	12,05	
Modèle	Effets fixes		1,98427	,23717	4,8112	5,7585			
	Effets aléatoires			,23717 ^a	4,6264 ^a	5,9433 ^a			-,18951

Descriptives

BCF.EBB

	N	Moyenne	Ecart type	Erreur standard	Intervalle de confiance à 95 % pour la		Minimum	Maximum	Variance intercomposantes
					moyenne				
					Borne inférieure	Borne supérieure			
0	14	25,0807	6,19587	1,65592	21,5033	28,6581	10,52	33,31	
1	14	23,7136	6,81542	1,82150	19,7785	27,6487	13,14	35,31	
2	14	27,6821	9,73394	2,60151	22,0619	33,3024	8,27	47,43	
3	14	30,0007	6,60787	1,76603	26,1854	33,8160	19,18	41,83	
4	14	29,8336	8,51611	2,27603	24,9165	34,7506	14,96	46,74	
Total	70	27,2621	7,88325	,94223	25,3824	29,1418	8,27	47,43	
Modèle	Effets fixes		7,69125	,91928	25,4262	29,0981			
	Effets aléatoires			1,25776	23,7700	30,7543			3,68448

Descriptives

BCF.PBS

	N	Moyenne	Ecart type	Erreur standard	Intervalle de confiance à 95 % pour la		Minimum	Maximum	Variance intercomposantes
					moyenne				
					Borne inférieure	Borne supérieure			
0	14	23,8179	5,56211	1,48654	20,6064	27,0293	13,69	34,19	
1	14	20,9764	7,02963	1,87875	16,9176	25,0352	1,00	30,99	
2	14	24,0564	6,90511	1,84547	20,0695	28,0433	13,32	43,22	
3	14	21,3900	5,14387	1,37476	18,4200	24,3600	13,14	32,57	
4	14	21,7486	7,22511	1,93099	17,5769	25,9202	,00	28,83	
Total	70	22,3979	6,37271	,76168	20,8783	23,9174	,00	43,22	
Modèle	Effets fixes		6,42954	,76848	20,8631	23,9326			
	Effets aléatoires			,76848 ^a	20,2642 ^a	24,5315 ^a			-,89652

Descriptives

POURCENTAGE DES NORM. EBB

	N	Moyenne	Ecart type	Erreur standard	Intervalle de confiance à 95 % pour la moyenne		Minimum	Maximum	Variance intercomposantes
					Borne inférieure	Borne supérieure			
					0	14			
1	14	77,7571	12,92795	3,45514	70,2928	85,2215	54,50	100,00	
2	14	75,5000	11,83209	3,16226	68,6684	82,3316	58,30	100,00	
3	14	72,9143	16,78002	4,48465	63,2258	82,6028	42,90	100,00	
4	14	73,5357	10,97603	2,93347	67,1983	79,8731	52,60	89,70	
Total	70	73,1671	13,20452	1,57824	70,0186	76,3156	42,90	100,00	
Modèle	Effets fixes		12,98714	1,55226	70,0671	76,2672			
	Effets aléatoires			1,95258	67,7459	78,5884			7,01535

Descriptives

POURCENTAGE DES NORM. PBS

	N	Moyenne	Ecart type	Erreur standard	Intervalle de confiance à 95 % pour la moyenne		Minimum	Maximum	Variance intercomposantes
					Borne inférieure	Borne supérieure			
					0	14			
1	14	75,5286	13,54545	3,62017	67,7077	83,3495	40,00	92,30	
2	14	80,4071	11,68987	3,12425	73,6576	87,1567	57,10	95,90	
3	14	76,9143	10,14934	2,71252	71,0542	82,7743	62,50	92,90	
4	14	68,3857	19,19687	5,13058	57,3018	79,4697	23,10	95,70	
Total	70	75,1086	13,90235	1,66165	71,7937	78,4235	23,10	95,90	
Modèle	Effets fixes		13,72986	1,64103	71,8312	78,3859			
	Effets aléatoires			1,96661	69,6484	80,5688			5,87282

Descriptives									
BENT TAIL.EBB									
	N	Moyenne	Ecart type	Erreur standard	Intervalle de confiance à 95 % pour la moyenne		Minimum	Maximum	Variance intercomposantes
					Borne inférieure	Borne supérieure			
0	14	9,8429	8,67877	2,31950	4,8319	14,8538	,00	25,00	
1	14	11,1143	10,28254	2,74812	5,1773	17,0512	,00	33,30	
2	14	11,3714	7,89152	2,10910	6,8150	15,9279	,00	24,20	
3	14	10,3857	7,83541	2,09410	5,8617	14,9097	,00	20,20	
4	14	6,6214	6,43789	1,72060	2,9043	10,3386	,00	18,20	
Total	70	9,8671	8,25753	,98696	7,8982	11,8361	,00	33,30	
Modèle	Effets fixes		8,32067	,99451	7,8810	11,8533			
	Effets aléatoires			,99451 ^a	7,1059 ^a	12,6283 ^a			-1,28965

Descriptives									
BENT TAIL.PBS									
	N	Moyenne	Ecart type	Erreur standard	Intervalle de confiance à 95 % pour la moyenne		Minimum	Maximum	Variance intercomposantes
					Borne inférieure	Borne supérieure			
0	14	6,2214	6,61062	1,76676	2,4046	10,0383	,00	18,20	
1	14	11,5429	6,39540	1,70924	7,8503	15,2354	,00	20,00	
2	14	5,7357	5,51496	1,47393	2,5515	8,9200	,00	18,50	
3	14	9,0643	6,17048	1,64913	5,5016	12,6270	,00	22,70	
4	14	11,5786	7,72391	2,06430	7,1189	16,0382	,00	24,00	
Total	70	8,8286	6,81497	,81454	7,2036	10,4535	,00	24,00	
Modèle	Effets fixes		6,52303	,77965	7,2715	10,3856			
	Effets aléatoires			1,25197	5,3526	12,3046			4,79781

Descriptives									
COILED TAIL.EBB									
	N	Moyenne	Ecart type	Erreur standard	Intervalle de confiance à 95 % pour la moyenne		Minimum	Maximum	Variance intercomposantes
					Borne inférieure	Borne supérieure			
0	14	16,0857	11,97137	3,19948	9,1737	22,9978	,00	41,20	
1	14	8,4286	7,81039	2,08741	3,9190	12,9382	,00	25,00	
2	14	11,8214	8,62877	2,30614	6,8393	16,8035	,00	33,30	
3	14	13,7500	13,49631	3,60704	5,9575	21,5425	,00	42,90	
4	14	14,6786	9,84387	2,63089	8,9949	20,3623	2,70	36,80	
Total	70	12,9529	10,59409	1,26624	10,4268	15,4789	,00	42,90	
Modèle	Effets fixes		10,56242	1,26245	10,4316	15,4741			
	Effets aléatoires			1,32623	9,2707	16,6351			,82549

Descriptives									
COILED TAIL.PBS									
	N	Moyenne	Ecart type	Erreur standard	Intervalle de confiance à 95 % pour la moyenne		Minimum	Maximum	Variance intercomposantes
					Borne inférieure	Borne supérieure			
0	14	17,9643	11,65198	3,11412	11,2366	24,6919	1,90	42,90	
1	14	10,7429	9,50164	2,53942	5,2568	16,2289	,00	30,00	
2	14	12,3429	11,69002	3,12429	5,5932	19,0925	1,20	42,90	
3	14	9,4714	9,97932	2,66709	3,7095	15,2333	,00	37,50	
4	14	14,6714	16,53455	4,41905	5,1247	24,2182	,00	61,50	
Total	70	13,0386	12,15814	1,45318	10,1396	15,9376	,00	61,50	
Modèle	Effets fixes		12,13000	1,44981	10,1431	15,9340			
	Effets aléatoires			1,50678	8,8551	17,2221			,84215

Descriptives

DISTAL DROPLET EBB

	N	Moyenne	Ecart type	Erreur standard	Intervalle de confiance à 95 % pour la moyenne		Minimum	Maximum	Variance intercomposantes
					Borne inférieure	Borne supérieure			
					0	14			
1	14	,5357	1,89234	,50575	-,5569	1,6283	,00	7,10	
2	14	,8214	2,12102	,56687	-,4032	2,0461	,00	6,70	
3	14	1,1214	2,99054	,79926	-,6053	2,8481	,00	11,10	
4	14	1,6571	3,29562	,88079	-,2457	3,5600	,00	11,10	
Total	70	1,4329	3,81582	,45608	,5230	2,3427	,00	25,00	
Modèle	Effets fixes		3,82394	,45705	,5201	2,3456			
	Effets aléatoires			,45705 ^a	,1639 ^a	2,7018 ^a			-,07639

Descriptives

DISTAL DROPLET PBS

	N	Moyenne	Ecart type	Erreur standard	Intervalle de confiance à 95 % pour la moyenne		Minimum	Maximum	Variance intercomposantes
					Borne inférieure	Borne supérieure			
					0	14			
1	14	,8143	2,65616	,70989	-,7193	2,3479	,00	10,00	
2	14	,3429	,85099	,22744	-,1485	,8342	,00	3,10	
3	14	,6500	1,33229	,35607	-,1192	1,4192	,00	3,70	
4	14	3,3071	3,70311	,98970	1,1690	5,4453	,00	9,50	
Total	70	1,2771	2,64170	,31574	,6473	1,9070	,00	10,00	
Modèle	Effets fixes		2,49030	,29765	,6827	1,8716			
	Effets aléatoires			,52921	-,1922	2,7465			,95737

Descriptives									
PROXIMAL DROPLET .EBB									
	N	Moyenne	Ecart type	Erreur standard	Intervalle de confiance à 95 % pour la moyenne		Minimum	Maximum	Variance intercomposantes
					Borne inférieure	Borne supérieure			
0	14	1,2714	2,67738	,71556	-,2744	2,8173	,00	8,30	
1	14	1,0429	2,12158	,56702	-,1821	2,2678	,00	6,10	
2	14	1,4857	2,25145	,60172	,1858	2,7857	,00	5,90	
3	14	,9143	2,55399	,68258	-,5603	2,3889	,00	9,10	
4	14	,1929	,72161	,19286	-,2238	,6095	,00	2,70	
Total	70	,9814	2,16268	,25849	,4658	1,4971	,00	9,10	
Modèle	Effets fixes		2,18092	,26067	,4608	1,5020			
	Effets aléatoires			,26067 ^a	,2577 ^a	1,7052 ^a			-,09761

Descriptives									
PROXIMAL DROPLET PBS									
	N	Moyenne	Ecart type	Erreur standard	Intervalle de confiance à 95 % pour la moyenne		Minimum	Maximum	Variance intercomposantes
					Borne inférieure	Borne supérieure			
0	14	,5786	1,52728	,40818	-,3033	1,4604	,00	5,10	
1	14	2,7571	5,43121	1,45155	-,3787	5,8930	,00	16,70	
2	14	,6500	1,13460	,30323	-,0051	1,3051	,00	3,10	
3	14	2,0571	2,94141	,78612	,3588	3,7555	,00	7,10	
4	14	3,0286	5,29345	1,41474	-,0278	6,0849	,00	19,20	
Total	70	1,8143	3,77164	,45080	,9150	2,7136	,00	19,20	
Modèle	Effets fixes		3,73605	,44654	,9225	2,7061			
	Effets aléatoires			,51502	,3843	3,2442			,32924

Descriptives									
DMR.EBB									
	N	Moyenne	Ecart type	Erreur standard	Intervalle de confiance à 95 % pour la moyenne		Minimum	Maximum	Variance intercomposantes
					Borne inférieure	Borne supérieure			
0	14	4,4643	5,50477	1,47121	1,2859	7,6426	,00	15,40	
1	14	2,1571	3,13288	,83730	,3483	3,9660	,00	9,10	
2	14	,9429	1,98251	,52985	-,2018	2,0875	,00	6,30	
3	14	,9643	2,01288	,53797	-,1979	2,1265	,00	6,20	
4	14	3,5714	4,57374	1,22238	,9306	6,2122	,00	13,30	
Total	70	2,4200	3,87390	,46302	1,4963	3,3437	,00	15,40	
Modèle	Effets fixes		3,71534	,44407	1,5331	3,3069			
	Effets aléatoires			,70267	,4691	4,3709			1,48278

Descriptives									
DMR.PBS									
	N	Moyenne	Ecart type	Erreur standard	Intervalle de confiance à 95 % pour la moyenne		Minimum	Maximum	Variance intercomposantes
					Borne inférieure	Borne supérieure			
0	14	1,7929	3,15898	,84427	-,0311	3,6168	,00	9,10	
1	14	3,4286	4,22983	1,13047	,9863	5,8708	,00	12,50	
2	14	1,0429	1,89075	,50532	-,0488	2,1345	,00	5,90	
3	14	2,9071	3,18131	,85024	1,0703	4,7440	,00	8,30	
4	14	2,1643	3,63479	,97144	,0656	4,2630	,00	9,30	
Total	70	2,2671	3,32102	,39694	1,4753	3,0590	,00	12,50	
Modèle	Effets fixes		3,30992	,39561	1,4771	3,0572			
	Effets aléatoires			,41791	1,1068	3,4274			,09069