

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE SAAD DAHLEB DE BLIDA 1
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE DES POPULATION ET DES ORGANISMES



MEMOIRE

Projet De Fin D'étude En Vue De L'obtention Du
Diplôme De Master2 En science de la nature et de la vie
Option Reproduction Animal

OPTIMISATION DE L'ANALYSE AUTOMATISE DE LA MORPHOLOGIE DU SPERMATOZOÏDE CANIN PAR LE SYSTEME SPERM CLASS ANALYSER (SCA®).

Présenté par : **CHERAIR KHADIDJA**

Devant le jury composé de :

Mme. Zatra	MAA	USDB 1	Présidente
Mme. Benazzouz F	MAA	USDB 1	Examinatrice
Mr. Belala R	MCB/ISV	USDB 1	Promoteur
Mr. Bessaad M.A	MCB/ISV	USDB 1	Co-Promoteur

ANNEE UNIVERSITAIRE 2016/2017

Remerciements

Merci Allah (Mon dieu) de m'avoir donné la capacité d'écrire et de réfléchir, la force d'y croire, la patience d'aller jusqu'au bout du rêve et la volonté d'entamer et de terminer ce mémoire

Avant toute chose, je remercie Dieu, le tout puissant, pour m'avoir donné la force, la patience, et la volonté pour achever ce modeste travail.

*Je tiens à remercier particulièrement mon promoteur **Mr Belala Rhida**. Qui me fait l'honneur de diriger ce travail de thèse.*

*Je tiens à remercier particulièrement mon cou-promoteur **Mr Bessaad M.A**. Qui me fait l'honneur de diriger ce travail de thèse et son encouragement.*

Qu'elle trouve ici l'expression de mes plus sincères et chaleureux remerciements.

***Mme ZATRA Y.** qui m'a fait l'honneur de présider mon jury de thèse.*

A notre Jury de Thèse.

***Mme Benazzouze** qui m'a fait l'honneur d'être examinateur de ce travail de thèse*

Qu'elle trouve ici l'expression de ma profonde considération.

*Mes sincères remerciements pour **Mme Benchikh Khadîdja** pour son aide précieuse et sa participation pour la réalisation ce modeste travail et son encouragement. Qu'elle trouve ici l'expression de mes plus sincères et chaleureux remerciements.*

*Nous remercions particulièrement le **Directeur du Laboratoire des Biotechnologies liées à la Reproduction Animale (L.B.R.A)** de l'université de **Blida1** pour nous avoir donné l'accès aux équipements de recherche et matériels de laboratoire nécessaires à la réalisation de ce travail.*

*Nous remercions également le **Directeur du Centre National d'Insémination Artificielle et d'Amélioration Génétique (C.N.I.A.A.G)** de **Baba Ali** d'avoir mis à notre disposition à titre gracieux dans le cadre d'une convention de collaboration entre le C.N.I.A.A.G et le L.B.R.A les produits chimiques, les réactifs et les colorants nécessaires à la réalisation d'une partie de ce travail. Que le C.N.I.A.A.G trouve ici l'expression de nos forts remerciements et notre sincère reconnaissance.*

Dédicaces

A mes parents : Grace à leurs encouragements et leurs grands sacrifices, ils ont pu créer le climat affectueux et propice à la poursuite de mes études.

Aucune dédicace ne pourrait exprimer mon respect, ma considération et mes profonds sentiments envers eux .

Je prie le bon dieu de bénir, de veiller sur eux, en espérant qu'ils seront toujours fiers de moi.

*A mes chers frères : surtout mon frère **Houari** qu'il trouve ici toute ma gratitude pour son encouragement toute au long de mes études.*

*A mon frère **Brahim**.*

*A mes sœurs : **Ghania, khadidja (Zahra)***

*A ma sœur **Naima** qui mon encourage.*

A mes oncles, mes tantes ; mes cousines et mes cousins

A toute la famille de Cherair, famille Ammam, famille Benchikh, Hamdaoui,

Benabderrahmen, famille Bensaada

*A ma cousine **Sabrina***

A Minou

A mes chers amis : Sara. Asma. Nadia, Doha,

A Mohammed

A Dr Hadj Brahim Nabil

Liste des abréviations

IA : Insémination artificielle

SCA: Sperm Class Analyser

CASA: computer Aided Sperm analyser

TRIS: Tri-hydroxy-methyl-amino methane

GnRH: Gonadotropin Releasing Hormone

LH: Luteinising Hormone

FSH: Follicula Stimulating Hormone

OMS: Organisation Mondiale de la Santé

IAM: Index Anomalies Multiples

PMA: Procreation Medical Assister

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Liste des figures

Figure 1. Schéma des organes génitaux du chien.....	3
Figure 2. Schéma de l'organisation du testicule et de l'épididyme.....	3
Figure 3. Schéma de la structure de la paroi des tubes séminifères.....	4
Figure 4a. Schéma de la structure du pénis.....	6
Figure 4b. Schéma de la structure du pénis.....	7
Figure 5. Les trois phases d'éjaculat du chien.....	8
Figure 6. Structure d'un spermatozoïde.....	8
Figure 7. Comptage des spermés à la cellule de Thoma.....	11
Figure 8. Exemples d'anomalies morphologiques sur des spermatozoïdes colorés au Spermac® : spermatozoïde bicéphale, microcéphale et spermatozoïde ayant effectué la réaction acrosomique.....	13
Figure9. Principales anomalies morphologiques des spermatozoïdes.....	14
Figure10. Les anomalies de la taille de la tête des spermatozoïdes.....	18
Figure11. Les anomalies de la forme et texture de la tête des spermatozoïdes.....	19
Figure12. Les anomalies de la pièce intermédiaire.....	20
Figure13. Les anomalies du flagelle.....	21
Figure 14 : les déférents paramètres qui évaluent la mobilité spermatique	27
Figure15 : matériel utilisé au laboratoire(LBRA).....	28
Figure16: les colorants utilisés pour l'analyse morphologiques des spermatozoïdes	29
Figure17 : chiens expérimentales.....	29
Figure 18 : Etuve utilisé pour l'incubation de solutions préparées	30
Figure 19 : Début de la récolte -Orientation caudale du pénis -fin de récolte.....	30
Figure 20 : Cellule de Thoma. Elle permet le comptage de spermatozoïdes grâce à une grille graduée.....	31

Figure 21a. Analyse de la variance ANOVA des taux d'anomalie (%) chien Willis.....	36
Figure 21b. Analyse de la variance ANOVA des taux d'anomalie (%) selon le colorant.....	37
Figure 21c. Spermatozoïdes avec une anomalie au niveau de la tête chez Willis.....	37
Figure 22a . Analyse de la variance ANOVA des taux d'anomalie (%) chien Enzo.....	39
Figure 22b . Analyse de la variance ANOVA des taux d'anomalie (%) selon le colorant.....	40
Figure 22c. Spermatozoïdes avec une anomalie au niveau de la tête chez Enzo.....	41
Figure 23a. Analyse de la variance ANOVA des taux d'anomalie (%) chien Bob.....	42
Figure 23b. Analyse de la variance ANOVA des taux d'anomalie (%) selon le colorant.....	43
Figure23c. Spermatozoïdes avec une anomalie au niveau de la tête chez Bob.....	44
Figure24a . Analyse de la variance ANOVA des taux d'anomalie (%) chien Roki.....	45
Figure 24b. Analyse de la variance ANOVA des taux d'anomalie (%) selon le colorant	46
Figure24c. Spermatozoïdes avec une anomalie au niveau de la tête chez Roki.....	47
Figure 25a . Analyse de la variance ANOVA des taux d'anomalies (%) chiens.....	48
Figure 25b . Analyse de la variance ANOVA des taux d'anomalie (%) selon le colorant.....	49

Liste des tableaux

Tableau 1. Description des trois phases de l'éjaculat du chien.....	8
Tableau 2. Echelle d'appréciation de la motilité massale du sperme du chien.....	10
Tableau 3. Classification des anomalies du spermatozoïde de chien.....	13
Tableau 4. Les normes du spermocytogramme.....	23
Tableau 5 : identification chaque animale.....	31.
Tableau 6 : Composition de diluer.....	33
Tableau 7 : Analyses statistiques des anomalies des spermatozoïdes chez Willis	36
Tableau 8 : Analyses statistiques des anomalies des spermatozoïdes chez Enzo.....	39
Tableau 9 : Analyses statistiques des anomalies des spermatozoïdes chez Bob.....	42
Tableau 10 : Analyses statistiques des anomalies des spermatozoïdes chez Roki	45
Tableau 11 : Analyses statistiques des anomalies des spermatozoïdes chez les chiens.....	48

Sommaire

INTRODUCTION	1
<i>Chapitre I : Partie bibliographique</i>	
1.1. Anatomie et rôles des différentes parties du tractus génital male du chien	3
2. la semence canine	8
3. Evaluation de la semence canine.....	10
4. Le spermocytogramme.....	16
5. Récolte de la semence de chien.....	24
6. Evaluation de la vitalité	27
7.L'analyse informatique de la semence (CASA : computerzed Assisted Sperm Analysis) :L'analyseur informatique de la semence ou communément appelé le système CASA	27
<i>Chapitre II : Matériel et Méthodes</i>	
1. objectifs	29
1.1. Matériel	29
2. Méthodes	31
3. Technique de coloration.....	34
4. Analyse statistique.....	35
<i>Chapitre III : Résultats et Discussion</i>	
3.1. Résultat	36
3.2. Discussion	49
<i>Conclusion générale</i>	
Conclusion	52
Références bilbiographique.....	53
Annexes	

Résumé

OPTIMISATION DE L'ANALYSE AUTOMATISE DE LA MORPHOLOGIE DU SPERMATOZOÏDE CANIN PAR LE SYSTEME SPERM CLASS ANALYSER (SCA®).

Le présent travail a pour objectif d'évaluer l'efficacité de deux techniques de coloration (Diff-Quick® et SpermBlue®) dans l'analyse de la morphologie spermatique du spermatozoïde canin par l'analyseur d'image : Sperm Class Analyzer (SCA®).

Pour cela, 10 éjaculats ont été récoltés à partir de 04 chiens adultes en bonne santé. Après un spermogramme de contrôle effectué pour confirmer la bonne qualité de la semence, les éjaculats ont été inclus ou exclus de l'étude. Après dilution et préparation de frottis sur lame de verre, deux colorations de commerce (Diff-Quick®, Spermblue®) ont été réalisées selon les recommandations du fabricant en variant la durée de contact avec le colorant (10-15mn vs 20-25mn) pour le Spermblue®. Après la coloration un montage à la solution EUKITT® a été réalisé.

Une analyse de morphologie a été effectuée au moyen d'un analyseur d'image Sperm Class Analyzer (SCA®, Evolution v. 6.2, Microptics, Spain). Les différentes anomalies de la tête et de la pièce intermédiaires ont été évaluées automatiquement et enregistrées sur les fichiers de données.

Pour la comparaison entre les deux colorants, une ANOVA a été réalisée à l'aide du logiciel SYSTAT, ver.12, SPSS 2009.

Nos résultats suggèrent que les anomalies morphologiques (tête et pièce intermédiaire) sont nettement mieux colorées avec le Diff-Quick® que le Spermblue®. Le Diff-Quick représente l'avantage d'une technique de coloration très simple, rapide et polyvalente.

Le colorant rapide Diff-Quick® semble être mieux adapté à l'évaluation des anomalies de la morphologie du spermatozoïde canin par le système SCA®.

Mots-clés: Spermatozoïde canine, Diff-Quick®, Spermblue®, Morphométrie, Sperm Class Analyzer (SCA®).

Abstract

OPTIMISATION OF DOG SERMATOZOAL AUTOMATIC MORPHOLOGICAL ANALYSIS BY THE SPERM CLASS ANALYSER (SCA®).

The aim of the present work was to evaluate two staining techniques (Diff-Quick® et SpermBlue®) while analyzing morphological abnormalities of dog spermatozoa by the Sperm Class Analyzer (SCA®).

10 ejaculates were collected from 4 adult and good health dogs. Ejaculates were included or excluded in the study depending on the quality of semen checked in an initial evaluation.

After dilution of semen and preparation of the smears, the two staining techniques were realized following the manufacturer's recommendations and varying the exposition time to the Steiner (10-15mn vs. 20-25mn) for Spermblue®. One's stained; the slides were mounted with EUKITT® solution.

Morphological abnormalities were analyzed by mean of a Sperm Class Analyzer (SCA®, Evolution v. 6.2, Microptics, Spain).

To compare between the two stainings, an ANOVA was performed using the software SYSTAT, ver.12, SPSS 2009

Our results suggested that the morphological abnormalities (Head, Mid-piece) were better stained with le Diff-Quick® compared to Spermblue®. Diff-Quick® has the advantage to be a quick, an easy and a polyvalent staining technique.

Diff-Quick® seems to be better adapted to morphology evaluation of dog spermatozoa by mean of Sperm Class Analyzer (SCA®).

Key words: Canine spermatozoa, Diff-Quick®, Spermblue®, Morphometry, Sperm Class Analyzer (SCA®)

ملخص

تحسين التحليل الآلي للسلائل المنوية البنيوي من قبل نظام " سبيرم كلاس أنليزر " (أس-س-ي).

تم تصميم هذا العمل لتقييم فعالية اثنين بواسطة (ديف-كويك وسبيرم-بلو) في تحليل من تقنيات تلطيخ مورفولوجيا المنوي من الحيوانات المنوية للكلاب من قبل محلل الصور محلل الحيوانات المنوية فئة "أس-س-ي".

لهذا، تم حصاد 10 قذائف من 4 كلاب أصحاب وبالغين، بعد فحص الحيوانات المنوية مع السيطرة التي أجريت للتأكد من نوعية جيدة من السلائل المنوي، وشملت ادماجها أو استبعادها من الدراسة. بعد تخفيف وإعداد المسحاة على الشريحة الزجاجية، اثنين من التلوين التجارية كل من (ديف-كويك وسبيرم-بلو) وفقا لتوصيات الشركة المصنعة من خلال تغيير وقت الاتصال مع الصبغة (10-15 دقيقة إلى 20-25 دقيقة) لأجل "سبيرم-بلو". بعد التلوين تم إجراء التركيب بواسطة "او كيت".

تم إجراء تحليل التشكل باستخدام محلل الصور. محلل الحيوانات المنوية

(، مكروبتيك، سبين 6.2 v ، إفلوتيون® SCA) .

تم تقييم الشذوذ المختلفة من الرأس والجزء الوسيط تلقائيا وتسجيلها على ملفات البيانات للمقارنة بين الأصباغ الاثنين، تم تنفيذ أنوفا باستخدام برنامج سيستات، الإصدار 12، سيس 2009.

نتائج تشير إلى أن التشوهات المورفولوجية (رأس ووسط قطعة) هي ملطخة أفضل بكثير مع "ديف-كويك" مقارنة مع "سبيرم-بلو". ويمثل "ديف-كويك" ميزة تقنية تلطيخ بسيطة جدا وسريعة ومتعددة الاستخدامات.

"ديف-كويك" صبغة سريعة ويبدو أنه الأنسب لتقييم تشوهات الشكل المنوي للكلاب من قبل النظام "أس-س-ي".

الكلمات الرئيسية: سبيرماتوزويد الكلاب، ديف كويك، سبيرم بلو، مورفومتري الحيوانات المنوية فئة محلل "أس-س-ي".

Introduction

La reproduction des carnivores est devenue une discipline de plus en plus importante en reproduction animale. S'articulant autour de plusieurs axes, notamment l'assistance à la fécondation. Cet axe nécessite, chez le mâle, une étude préalable et indispensable de la semence afin d'en prédire ses qualités fécondantes.

L'analyse de la semence se pratique conventionnellement sur deux plans macroscopique et microscopique. Ce dernier s'appelle le spermogramme et comprend la numération des spermatozoïdes, l'analyse de la mobilité et de la vitalité. L'analyse s'adressant à l'évaluation de la morphologie des spermatozoïdes s'appelle le spermocytogramme.

Le spermocytogramme se fait classiquement par microscopie à travers une appréciation visuelle des anomalies touchant les différents segments du spermatozoïde à savoir la tête, la pièce intermédiaire et le flagelle. Cette technique classique (microscopie) demeure entachée d'une grande part de subjectivité (appréciation visuelles des anomalies) et souffre par conséquent d'une grande variabilité des résultats entre les différents manipulateurs ainsi que les différents laboratoires (AUGER J. et EUSTACHE F., 2000).

Avec l'avènement de l'analyse spermatique assistée par ordinateur (CASA : Computer Aided Sperm Analysis), initialement dédiée à l'analyse automatique de la mobilité spermatique, les chercheurs se sont intéressés à l'utilisation de cet outil biotechnologique (CASA) dans l'analyse de la morphologie des spermatozoïdes (morphométrie).

Le principe de la morphométrie par CASA est basée sur la capture d'image, l'identification et la mesure micrométrique de plusieurs dimensions des différentes parties du spermatozoïde (Noyau, acrosome et pièce intermédiaire). Cette morphométrie dépend de la technique de coloration utilisée qui doit permettre au système d'analyse d'image de différencier nettement entre les segments du spermatozoïde pour pouvoir les mesurer.

Comparée à l'analyse classique de la morphologie, la morphométrie par CASA présente les avantages de la précision, de la rapidité d'analyse et de l'automatisation. Cependant, la problématique de cette technique réside dans le choix de la coloration optimale ou différentielle permettant l'identification des différentes parties du spermatozoïde.

En semence animale, plusieurs systèmes CASA ainsi que plusieurs techniques de coloration ont été testés dans l'analyse automatisée de la morphologie spermatique (HIDALGO *et al.*, 2005).

En semence canine, le système SCA (Sperm Class Analysis) a déjà été validé pour l'analyse de la mobilité (DORADO *et al.*, 2011), par contre aucune étude avant le présent travail n'a été faite en vue de choisir une coloration optimale pour la morphométrie par ce système CASA.

L'objectif de ce présent travail est d'optimiser l'analyse de la morphologie du spermatozoïde canin par le système « SCA : Sperm Class Analyser » en comparant deux techniques de coloration à savoir la coloration « Diff-Quik® » et la coloration « Sperm-Blue® ».

PARTIE
BIBLIOGRAPHIQUE

MATERIEL
&
METHODES

RESULTATS
&
DISCUSSION

CONCLUSION

INTRODUCTION

REFERENCES
BIBLIOGRAPHYQUE

1.1. ANATOMIE ET ROLES DES DIFFERENTES PARTIES DU TRACTUS GENITAL MALE DU CHIEN

1.1.1 Les testicules

Les testicules du chien, de forme ovoïde, sont situés en région périnéale basse où ils sont protégés, de l'extérieur vers l'intérieur, par le scrotum, la tunique vaginale et l'albuginée (SETCHELL, 1991) (figure 1).

Chaque testicule est divisé en lobules spermatiques par des cloisons émanant de l'albuginée (voir figure 2). Chacun de ces lobules est composé de tubes séminifères, pelotonnés sur eux-mêmes, et de tissu interstitiel.

La paroi des tubes séminifères est constituée de cellules de Sertoli et de cellules germinales en différenciation (voir figure 3).

Les cellules de Sertoli assurent la protection et la nutrition des cellules germinales ainsi que la production de fluide tubulaire et d'œstrogènes. Parallèlement, les cellules germinales subissent la spermatogenèse : différenciation des spermatogonies en spermatozoïdes, dont la durée moyenne est de 62 jours. A la fin de cette différenciation, les spermatozoïdes, immobiles, sont libérés dans la lumière des tubes séminifères et sont acheminés vers le rete testis par des contractions péristaltiques.

Le tissu interstitiel des testicules correspond à un tissu conjonctif lâche qui comprend des éléments vasculaires, lymphatiques et nerveux.

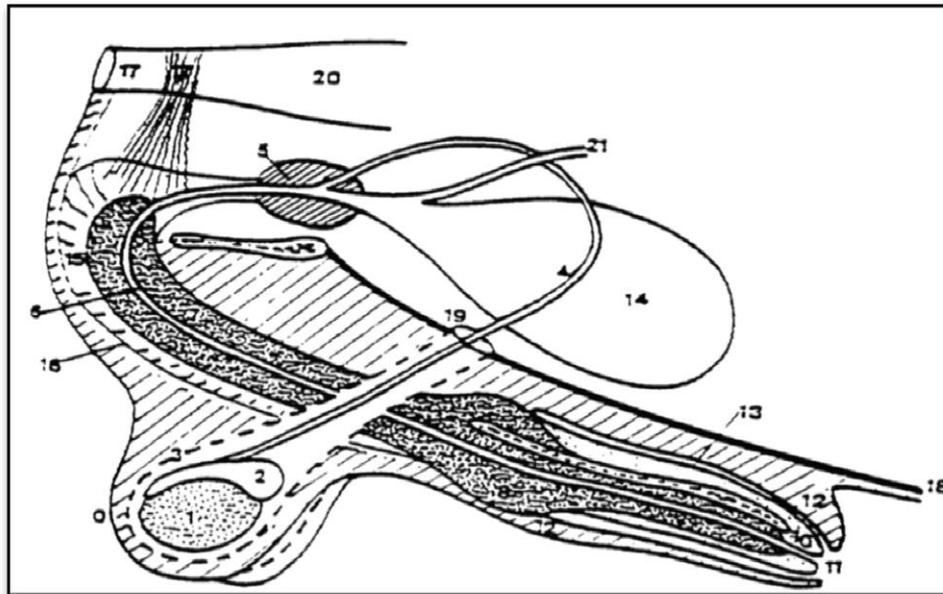
Il contient également les cellules de Leydig qui assurent la synthèse des hormones sexuelles mâles, principalement la testostérone.

Les testicules possèdent donc deux fonctions essentielles

- une fonction exocrine : l'élaboration des gamètes mâles ou spermatozoïdes, et
- une fonction endocrine : la production d'hormones sexuelles responsables du développement et du maintien des caractères sexuels mâles.

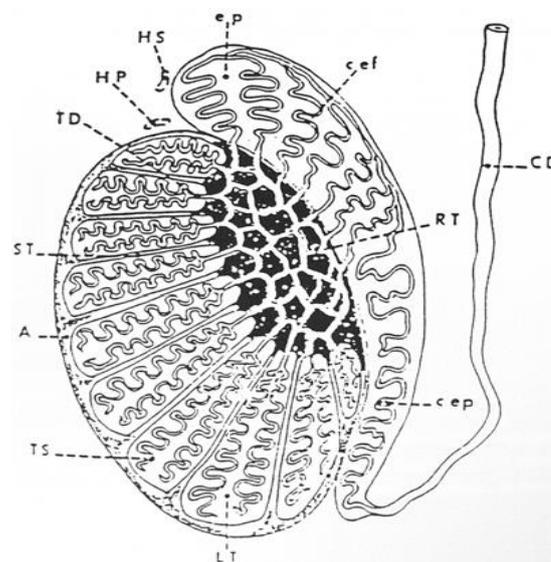
Ces deux fonctions s'effectuent sous contrôle de l'axe hypothalamo-hypophysaire.

L'hypothalamus sécrète de la GnRH (Gonadotropin Releasing Hormone) qui stimule la sécrétion de LH (Luteinising Hormone) et de FSH (Follicula Stimulating Hormone) par l'hypophyse. La FSH stimule la spermatogenèse alors que la LH stimule la spermatogénèse (dernière phase de la spermatogenèse), la libération des spermatozoïdes dans la lumière des tubes séminifères et la production d'hormones sexuelles par les cellules de Leydig



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

Figure 1. Schéma des organes génitaux du chien (d'après MIALOT, 1984)



- | | | |
|-------------------------|-----------------------|--------------------------|
| A : Albuginée | HS : Hydatide sessile | cep : Canal épидидymaire |
| ST : Septum testis | ep : Epididyme | TS : Tube séminifère |
| HP : Hydatide pédiculée | CD : Canal déférent | LT : Lobe testiculaire |
| cef : Cônes efférents | RT : Rete testis | |

Figure 2. Schéma de l'organisation du testicule et de l'épididyme (d'après BUE, 1992)

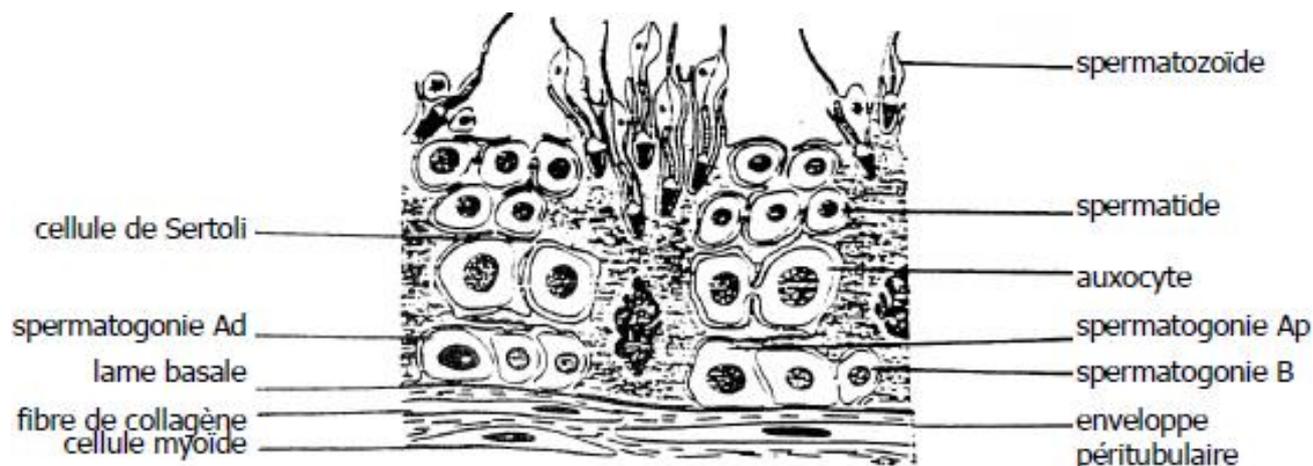


Figure 3. Schéma de la structure de la paroi des tubes séminifères (d'après BUE, 1992)

1.1. 2. Les épидидymes

Chaque épидидyme, recouvrant le testicule correspondant, comporte trois parties :

- une tête, fixée à l'extrémité antéro-inférieure du testicule par le ligament de la tête de l'épididyme,
- un corps, allongé, solidarisé à la face latérale du testicule par un court frein-séreux, et une queue, attachée à l'extrémité caudée du testicule par le ligament de la queue de l'épididyme et par le ligament propre du testicule.

La tête de l'épididyme est composée d'amas flexueux de canaux efférents, ou canalicules, issus du rete testis. Ces canalicules s'anastomosent ensuite pour former un canal épидидymaire unique, constituant le reste de l'organe (voir figure 2).

La progression des spermatozoïdes à travers l'épididyme est permise par les battements des cils de l'épithélium des canalicules, par les sécrétions épithéliales et par les contractions péristaltiques de la couche fibro-musculaire entourant l'épithélium des canaux.

Les substances sécrétées par l'épithélium épидидymaire permettent également aux spermatozoïdes d'acquérir leur motilité et leur pouvoir fécondant.

La queue de l'épididyme assure le stockage des spermatozoïdes, dont la survie est permise par les sécrétions épидидymaire et la mise en anaérobiose.

Les épидидymes assurent ainsi le transport, la maturation et le stockage des spermatozoïdes (SETCHELL, 1991)

1.1.3. Les canaux déférents

Chaque canal déférent fait suite au conduit épидидymaire correspondant et chemine de la queue de l'épididyme jusqu'à l'urètre (VAISSAIRE, 1977) (voir figure 1).

La paroi de ces canaux est composée de fibres musculaires lisses, de fibres élastiques et d'une muqueuse.

Les canaux déférents permettent de transporter les spermatozoïdes et les sécrétions épидидymaire jusqu'à l'urètre lors de l'éjaculation.

1.1.4. La prostate

La prostate, de structure bilobée, est située autour de l'urètre proximal, en arrière du col vésical (VAISSAIRE, 1977) (voir figure 1).

Son parenchyme est divisé en lobules irréguliers, composés de glandes tubulo-alvéolaires et d'un stroma riche en fibres musculaires, en vaisseaux et en nerfs.

Les sécrétions des glandes tubulo-alvéolaires sont collectées par des canalicules prostatiques qui s'abouchent dans l'urètre.

La prostate est la glande accessoire la plus importante chez le chien. Sous contrôle des androgènes, elle sécrète le liquide prostatique qui constitue la majeure partie de l'éjaculat. Ce liquide assure la dilution, le transport, la nutrition, la protection et la maturation des spermatozoïdes.

1.1.5. L'urètre

L'urètre est un conduit génito-urinaire qui chemine de la vessie à l'extrémité du gland du pénis (VAISSAIRE, 1977) (voir figure 1).

Il se divise en trois parties : une partie prostatique, une partie pelvienne et une partie pénienne, et il est constitué d'une tunique musculaire, de tissu érectile et d'une muqueuse.

L'urètre a pour rôle l'acheminement des spermatozoïdes, des sécrétions épидидymaire et prostatiques jusqu'à son ostium externe, situé à l'extrémité du gland du pénis.

1.1.6. Les glandes de Littré

Les glandes de Littré sont situées le long de l'urètre pénien.

Elles élaborent, en association avec la muqueuse urétrale, la phase urétrale ou prés-spermatique de l'éjaculat (VAISSAIRE, 1977).

1.1.7. Le pénis

Le pénis est situé en région sous-pubienne. Sa partie terminale est protégée par un repli cutanéomuqueux : le prépuce.

Le pénis se divise en trois parties :

- la racine, extrémité fixe, attachée à l'arcade ischiatique,
- le corps, cylindroïde, relativement court,
- le gland ou extrémité libre. Le pénis est constitué de l'urètre pénien, de tissus érectiles (les corps caverneux et le corps spongieux du gland), de muscles (bulbo-spongieux, ischio-caverneux et rétracteur du pénis) et d'un os pénien (voir figures 4a et 4b). Il s'agit de l'organe copulateur mâle.

Suite à la stimulation des zones érogènes, les fibres parasympathiques, issues du centre médullaire sacré, provoquent la vasodilatation des artères des tissus érectiles ce qui engendre l'érection. Parallèlement, les fibres somatiques du nerf hypogastrique induisent la contraction du muscle ischio-caverneux qui empêche le retour veineux et permet le maintien de l'érection.

Dans un second temps, les influx nerveux provenant des fibres somatiques et orthosympathiques provoquent la stimulation des glandes annexes et la contraction des fibres musculaires lisses et striées de l'ensemble de l'appareil génital ce qui permet l'éjaculation. L'éjaculat comporte trois phases émises successivement : la phase urétrale ou préspermatique, la phase spermatique ou épидидymaire et la phase prostatique (VAISSAIRE, 1977).

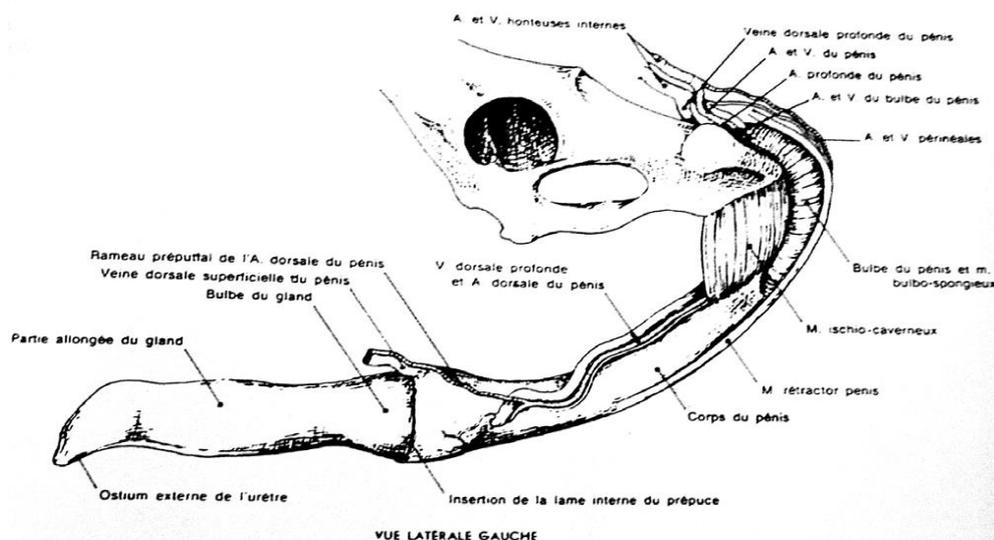


Figure 4a. Schéma de la structure du pénis (d'après BARONE, 1978)

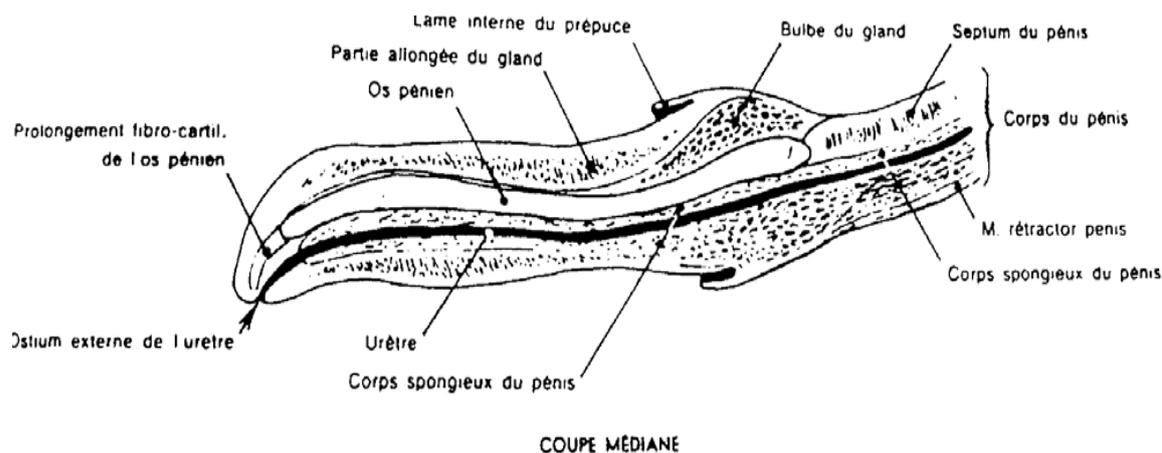


Figure 4b. Schéma de la structure du pénis (BARONE, 1978)

2. la semence canine

2.1. SPERME CANIN

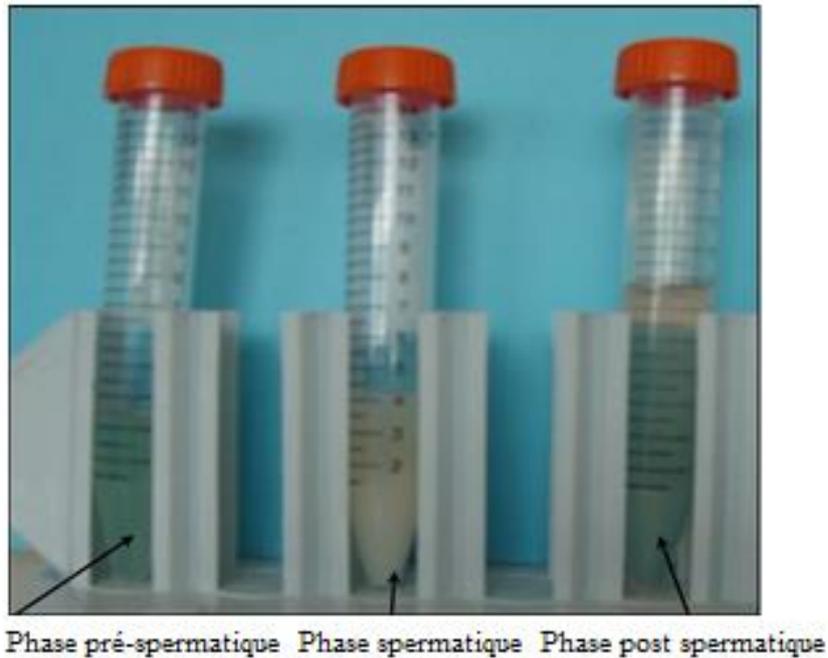
Le sperme canin est un liquide contenant les gamètes mâles (les spermatozoïdes) et les sécrétions provenant des glandes sexuelles accessoires. Ces deux éléments se mélangent lors de l'éjaculation (PRINGS, 1998).

2.2. Caractéristique de la semence

L'éjaculat de chien est composé de trois fractions différentes du point de vue origine, composition, volume et même leur durée d'émission ainsi que leur concentration en spermatozoïdes. (Tableau 1)

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

Phases	Origine	Couleur consistance en Spermatozoïdes	Durée d'émission	Volume ml	PH	Concentration en Spermatozoïdes 10 ⁶ /ml)
Phases pre-spermatique	Fraction urétrale	Blanc jaunâtre	30 à 50 Secondes	0.2-2	6.2 - 6.5	< 3
Phase spermatique	Fraction épидidymaire	Blanchâtre aqueux	2 à 3 Minutes	0.5-3.5	6.3 - 6.6	400
Phase post-spermatique	Fraction prostatique	Clair visqueux	5 à 7 Minutes	3-30	6.5 - 7.0	Très rare Spermatozoïdes
-	Ejaculat complet	Blanchâtre	7 à 10 Minutes	4-35	-	environ 400



**Figure 5 : les trois phases d'ejaculat du chein
(BRIFFAUT AS;2007)**

2.3. Composition de la semence canine

2. 3.1. Spermatozoïde

2.3.1.1. Définition

Le spermatozoïde désigne un gamète (cellule reproductrice) mâle produit par les testicules

Le spermatozoïde mesure entre 62 et 66 μm , sa tête est ovale et aplatie dorso-ventralement. Le flagelle propulse le spermatozoïde à une vitesse moyenne de 45 $\mu\text{m/s}$ (FONTBONNE et DUMONT,1992).

2.3.1.2 Description du spermatozoïde

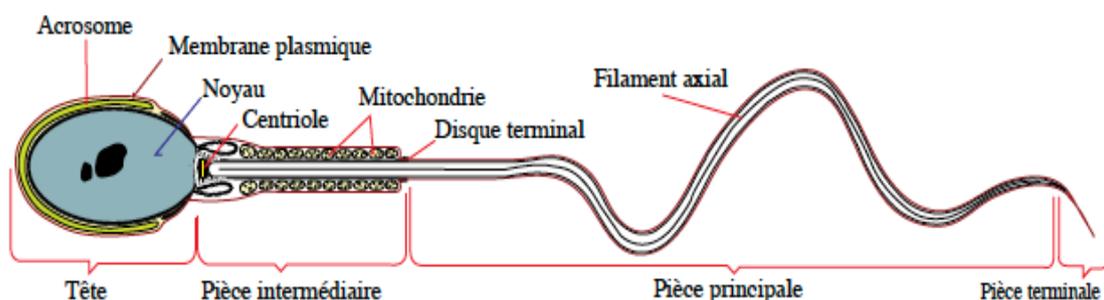


Figure 6 : Structure d'un spermatozoïde

2.3. 2. Le liquide séminal

Le liquide séminal représente plus des trois quarts du volume de l'éjaculat. Il est sécrété par les glandes annexes : la prostate et les glandes de Littré. Il contient des glucides, lipides, protéines, hormone, des ions et des électrolytes pour assurer le transport et la nutrition des spermatozoïdes.

3. Evaluation de la semence canine

3.1. Le spermogramme

Le spermogramme consiste en une mesure des aspects physiques du sperme : volume, aspect, ph, motilité, numération. (FONTBONNE et DUMONT, 1992).

3.1.1. Volume

Variable en fonction des individus, de leur âge, de leur taille et de la fréquence des récoltes.

3.1.2. Aspect

l'éjaculat complet est de couleur blanchâtre (Voir Tableau I).

3.1.3. Ph

varie de 6.2 à 7 selon les trois phases (Voir Tableau I).

3.1.4. Motilité

La motilité des spermatozoïdes doit être évaluée dans les plus brefs délais après la récolte.

3.1.4.1 Motilité massale

L'évaluation de la motilité massale au grossissement x40 permettra d'apprécier les mouvements de réunion et de dispersion des spermatozoïdes et sera notée de 0 à 5

Tableau 2 : Echelle d'appréciation de la motilité massale du sperme du chien
(D'après FONTBONNE, 1993)

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

3.1.4.2. Motilité individuelle

L'évaluation de la motilité individuelle au grossissement x40 permettra de déterminer le Pourcentage de spermatozoïdes mobiles qui progressent d'une façon rectiligne (fléchant). Un sperme de bonne qualité présentera plus de 70 % de spermatozoïdes fléchants (LINDEFORSBERG, 1995).

3.1.5. Numération

Des techniques automatisées (au spectrophotomètre) permettent le comptage des spermatozoïdes mais la technique la plus employée et la moins onéreuse reste le comptage manuel à l'aide de cellules hématimétriques. Au CERCA, des cellules de Thoma sont employées pour la numération, nous développerons donc cette méthode. Cependant, des cellules de Malassez, de Neubauer ou d'autre type conviennent tout aussi bien, il suffit d'adapter les dilutions et le calcul au volume de la cellule employée.

La dilution est adaptée à la concentration initiale du sperme, ainsi, si le sperme est très peu concentré (translucide), une dilution au 1/10^{ième} ou 1/20^{ième} sera effectuée. Par contre si le sperme est concentré (aspect laiteux) une dilution au 1/100^{ième} ou 1/200^{ième} sera préférable. La dilution se fait avec une solution de chlorure de sodium hypertonique à 3%, cette solution hypertonique engendre la mort des spermatozoïdes sans provoquer leur lyse. Ainsi, les spermatozoïdes sont immobiles et le comptage est facilité. Après homogénéisation du mélange, la solution est déposée à l'aide d'une micropipette afin de remplir par capillarité, sans bulle d'air, la chambre de l'hématimètre. Il faut alors laisser sédimenter pendant quelques minutes avant de procéder au comptage des spermatozoïdes. Avant le comptage, il faut bien vérifier à faible grossissement, que la répartition des éléments soit homogène, au moindre doute, le mélange sera homogénéisé de nouveau et le montage recommencé. Après repérage des limites de la cellule (grossissement x100), les éléments sont comptés au microscope au grossissement x400. La lame est balayée de façon méthodique, de gauche à droite et du haut vers le bas. En général les spermatozoïdes sont comptés sur 5 grands carrés. Afin d'éviter de surévaluer le nombre de spermatozoïdes, pour les éléments situés entre deux carrés, ne sont comptés que ceux qui sont à cheval sur les graduations, en général celles formant la lettre L (Figure 7).

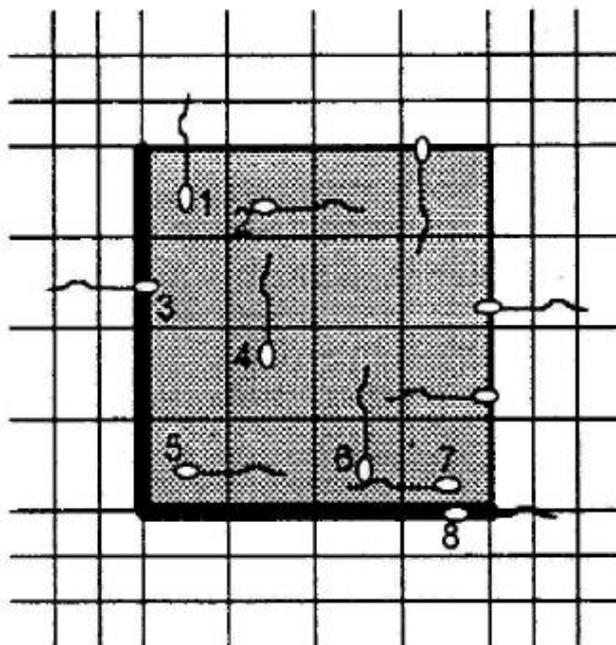


Figure 7 : comptage des spermés à la cellule de Thoma

Le principe général du calcul du nombre de spermatozoïdes figure dans la formule énoncée ci-dessous :

(Nombre de spermatozoïdes comptés x facteur de dilution) / (Surface considérée (mm²) x profondeur des chambres) = spermatozoïdes par ml de semence. Le CERCA dispose également d'un appareil portatif, l'ACCUREAD® IMV Technologies, pour évaluer la concentration de la semence. Il s'agit d'un instrument basé sur le principe de la mesure de turbidimétrie. Les mesures sont obtenues grâce à l'association d'une source lumineuse de type Diode Electro Luminescente qui émet à 595 nm et d'une fibre optique conduisant le signal lumineux jusqu'au détecteur. Cet appareil a été validé initialement pour la mesure de la concentration en spermatozoïdes dans le sperme bovin puis le principe a été élargi à d'autres espèces, dont l'espèce canine grâce à la détermination par le constructeur des équations de paramétrage adaptées. Cet appareil présente une bonne répétabilité et une bonne fiabilité (il présente, selon le constructeur, une meilleure fiabilité et une meilleure répétabilité que la spectrophotométrie). Le prix de l'Accuread® est de 990 euros (prix indiqué pour le mois de décembre 2007), auxquels il faut rajouter le petit matériel nécessaire à son fonctionnement (cuves, pipettes, cônes et filtres).

3.1.6. Morphologie des spermatozoïdes

La morphologie des spermatozoïdes doit être prise en compte dans l'analyse de la semence chez le chien. **Un éjaculat contenant plus de 30% de formes anormales est**

considéré comme anormal (Oettle, 1993). Les formes anormales sont classées en deux catégories selon qu'elles sont considérées comme primaires (c'est-à-dire les anomalies résultant d'un défaut de la spermatogenèse) ou secondaires (survenant lors de la maturation ou de la préparation de la lame). Le Tableau III présente la liste des anomalies primaires et secondaires dans l'espèce canine. La classification en anomalies majeures et mineures peut également être utilisée mais cette dernière classification est plus délicate à utiliser car elle suppose une connaissance des conséquences des défauts morphologiques sur la fertilité dans l'espèce canine (Root, 2007).

Tableau 3 : Classification des anomalies du spermatozoïde de chien (d'après Freshman, 2002).

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

En pratique, on effectue une coloration en éosine-nigrosine ou une coloration grâce au réactif de Harris-Shore ou encore au Spermac® qui est une préparation commerciale. Pour une coloration à l'éosine-nigrosine, une goutte de semence est mélangée à deux gouttes d'éosinenigrosine. Ensuite, l'étalement est effectué au moyen d'une lame rodée inclinée à 45° et la lame est séchée à l'air libre par agitation. La lame est ensuite observée au grossissement x1000 à immersion. Il convient de noter les anomalies sur au moins 200 spermatozoïdes. Si un spermatozoïde présente plusieurs anomalies, seule celle considérée comme majeure sera comptabilisée. Seules les têtes isolées sont comptabilisées, les queues isolées ne sont pas prises en compte. Au CERCA, les anomalies prises en compte

sont classées en six catégories, ainsi le pourcentage total de spermatozoïdes anormaux, les anomalies de la tête, de la pièce intermédiaire, du flagelle ainsi que le pourcentage de spermatozoïdes présentant des gouttelettes proximales et le pourcentage de décapités sont comptabilisés. Il faut cependant rester prudent pour l'interprétation du spermocytogramme car des formes anormales sont toujours présentes dans la semence d'animaux considérés comme fertiles c'est pourquoi il faut tenir compte de la proportion et de la nature de ces anomalies (Burke, 1986). La coloration à l'éosine-nigrosine sert également à déterminer le pourcentage de spermatozoïdes « vivants ». La membrane des spermatozoïdes morts est perméable au colorant et le laisse pénétrer dans le compartiment intra-cellulaire, les spermatozoïdes morts sont donc colorés en rose alors que les vivants restent incolores. Ce colorant reste très utilisé en routine chez les espèces domestiques car son utilisation est simple et rapide mais un problème courant avec ce colorant est que l'hypoosmolarité de la solution peut entraîner la mort et la lyse des spermatozoïdes, ce qui représente une source d'artefacts (Peña Martinez, 2004). D'autres colorants tels que la préparation commerciale Spermac®, également employée au CERCA, peuvent être utilisés. La figure 8 présente des spermatozoïdes après coloration au Spermac®.

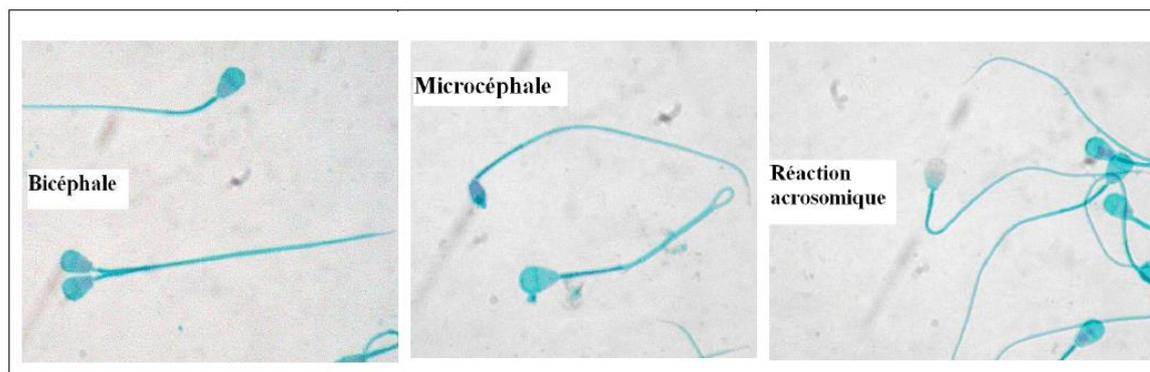
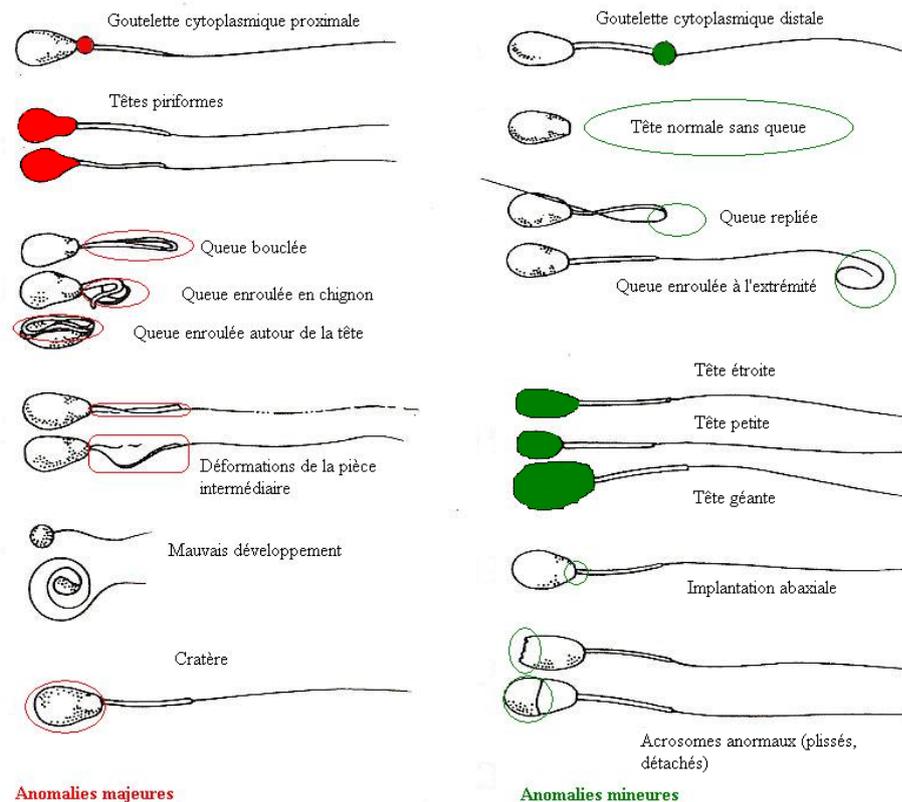


Figure 8 : Exemples d'anomalies morphologiques sur des spermatozoïdes colorés au Spermac® : spermatozoïde bicéphale, microcéphale et spermatozoïde ayant effectué la réaction acrosomique (CERCA, 2007).

Bien que la coloration des lames soit plus longue avec ce colorant qu'avec l'éosine-nigrosine, ce produit reste intéressant car il colore la région post-acrosomique et nucléaire en rouge et l'acrosome, la pièce intermédiaire ainsi que la queue en vert. Cette coloration permet d'apprécier les anomalies morphologiques classiques mais aussi les spermatozoïdes ayant effectué la réaction acrosomique. En dernier lieu, le nombre total de spermatozoïdes par éjaculat est multiplié par le pourcentage de spermatozoïdes morphologiquement normaux afin d'obtenir le nombre de spermatozoïdes morphologiquement normaux présents dans l'éjaculat considéré. L'examen

morphologique permet également de mettre en évidence la présence d'éléments en quantité anormalement élevée comme les leucocytes qui peuvent signer une infection du tractus génital ou encore des spermatozoïtes ou spermatoïdes qui révèlent une anomalie fonctionnelle testiculaire. La présence de ces éléments doit conduire à une investigation approfondie du dysfonctionnement.



A : Anomalies majeurs

1. Gouttelettes cytoplasmiques proximales.
2. Têtes piriformes.
3. Queues bouclées ou enroulées en chignon, queues enroulées autour de la tête.
4. Déformations de la pièce intermédiaire.
5. Mauvais développement.
6. Cratères.

B : Anomalies mineures

1. Gouttelettes cytoplasmiques distales.
2. Têtes normales sans queue.
3. Queues repliées ou enroulées à l'extrémité.
4. Têtes étroites, petites Ou géantes.
5. Implantation a axiale.
6. Acrosomes anormaux (plissés ou détachés).

Figure9.Principales anomalies morphologiques des spermatozoïdes, d'après (Ott, Goffaux et al., 1987).

4. Le spermocytogramme

4.1. Définition (AUGER J., EUSTACHE F ; 2000)

C'est l'étude morphologique ou cytologique des spermatozoïdes. Cette étude comprend l'évaluation du pourcentage des spermatozoïdes normaux et la détermination des anomalies morphologiques des spermatozoïdes. Il constitue un temps indispensable pour l'analyse du sperme car il permet parfois de poser le diagnostic étiologique et c'est aussi un indicateur utile pour déterminer des facteurs du micro- environnement (facteurs physiques et chimiques ; le stress) pouvant moduler ou endommager la spermatogenèse. C'est une analyse simple mais présente des difficultés pouvant entraîner une conséquence sur la fiabilité des résultats d'un laboratoire à l'autre. Ces difficultés peuvent être :

- L'utilisation de systèmes de classification multiples : dans les années cinquante, il existait plus d'une dizaine de systèmes et jusqu'à présent il n'y a pas un système de classification universelle.
- L'absence de définition précise et détaillée dans les systèmes de classification ; et l'absence de règle pour le classement des anomalies morphologiques.

4.2. Techniques du spermocytogramme

4.2.1. Préparation des frottis

Les frottis réalisés selon l'une des techniques de confection proposée dans le manuel de l'OMS pour l'analyse du sperme. La technique consiste à déposer 10 microlitres du sperme bien homogénéisé à l'extrémité d'une lame et à étaler cette goutte en s'aidant d'une autre lame inclinée à 45 degré par rapport à la première. Dans ces conditions, on obtient un frottis très épais. Les frottis une fois séchés à l'air sont fixés dans un mélange de $\frac{3}{4}$ d'éthanol et $\frac{1}{4}$ d'acide acétique pendant une minute (OMS ; 1993).

4.2 .2 La technique de coloration

CLAVERT et coll avaient effectués une enquête sur les pratiques du spermogramme en France, ils ont montré que plus de cinq techniques étaient utilisées pour la coloration des spermatozoïdes (CLAVERT A, BOURGUIGNAT., SIEST J P., FERARD G ; 1997). L'OMS dans son manuel ne s'est prononcée sur la technique de coloration optimale pour les spermatozoïdes humains. Elle indique la coloration de Giemsa, de Papanicolaou modifiée pour les spermatozoïdes, de Bryan-Leishman, de Shorr (OMS). Actuellement la coloration de Hemalun-Shorr (qui associe un colorant nucléaire à un colorant cytoplasmique) est utilisée parmi ces techniques. Elle semble supérieure à la méthode de

Papanicolaou modifiée pour la reconnaissance des pièces intermédiaires et des flagelles. Il y a aussi des colorants prêts à l'emploi qui sont commercialisés (le Spermio-Scan).

4.2.3- Technique de lecture

La lecture des lames est faite à l'objectif X 100 à immersion. En cas de doute sur un critère de taille, l'un des oculaires est muni d'un réticule gradué (nécessaire pour prendre une décision de classification). La lecture se fait en queue de frottis sur des champs microscopiques. En cas d'anomalies de viscosité, des spermatozoïdes en petit nombre peuvent se présenter de profil (l'aspect de profil se caractérise comme une flamme de bougie). Un seul champ ne doit pas être lu en cas de l'échantillon concentré.

4.3. Méthodes de classifications

4.3.1- Méthode de TYGERBERG et de KRUGER (KRUGER TF., ACOSTA AA., SIMMONS KF., et al ; 1998)

Elle est uniquement basée sur une évaluation très stricte des seuls spermatozoïdes typiques (les spermatozoïdes 'top model'). Elle recense une seule anomalie. Le recensement de l'anomalie se fait par ordre d'importance : acrosome, tête, pièce intermédiaire, flagelle.

KRUGER distingue 3 groupes de populations en fonction de pourcentage de

Formes typiques

- Pourcentage des formes typiques supérieur à 14% : le sperme est normal ;
- Pourcentage des formes typiques compris entre 4-14% : c'est le groupe G-Pattern (bon pronostic)
- Pourcentage des formes typiques inférieur à 4% : c'est le groupe PPattern (mauvais pronostic).

4.3.2. Classification de DAVID : (DAVID G., BISSON JP., CZYGLIK F et al.1975, AUGER J., EUSTACHE F.2000)

Elle repose sur la prise en compte de toutes les anomalies observées grâce à un système de classification à entrées multiples. Compte tenu de l'inhomogénéité du sperme humain et de la faible fréquence de certaines anomalies, cent spermatozoïdes au minimum doivent être classés pour une évaluation correcte du pourcentage des spermatozoïdes typiques et du profil des différentes atypies. Cette recommandation est cependant parfois impossible à suivre lorsque la concentration de spermatozoïdes est très faible. Dans ces cas, la classification peut être faite à partir de cinquante spermatozoïdes, mais le résultat

pour les spermatozoïdes normaux et anormaux ne doit pas être rendu en pourcentage et la conclusion doit tenir compte de la fiabilité diminuée de la fréquence des anomalies retrouvées, notamment lorsqu'il s'agit d'anomalies rares (**GENEVIÉVE GRIZARD., CLÈMENTI JIMÉNEZ ; 1997**). Au début des années quatre-vingt-dix, la classification fut modifiée grâce à l'initiative de plusieurs biologistes qui l'utilisent très régulièrement. Cette modification a permis de diviser la catégorie tête régulière en deux parties distinguées : une part les atypies de la région acrosomique et d'autre part les atypies de la région post acrosomique. La classification de David modifiée recense en dehors des spermatozoïdes morphologiquement normaux :

□ Sept anomalies de la tête : (Fig.10 et 11)

- Tête allongée : le grand axe est plus long que la normale et le petit axe présente une longueur normale.
- Tête amincie : le petit axe a une longueur plus petite que la normale et le grand axe présente une longueur normale.
- Tête microcéphale : le grand axe et le petit axe sont plus petit que la normale.
- Tête macrocéphale : le grand axe et petit axe sont plus grands que la normale.
- Tête multiple : plus d'une tête par spermatozoïdes.
- Tête à acrosome anormal ou absent : l'acrosome normal occupe 40-70% de la surface de l'acrosome. L'acrosome normal joue un rôle important dans l'interaction des spermatozoïdes avec l'ovocyte.
- Tête présentant une base (région post- acrosomique) anormale : cette anomalie correspond à un défaut de la morphogenèse de la tête et ou du noyau dans sa partie distale.

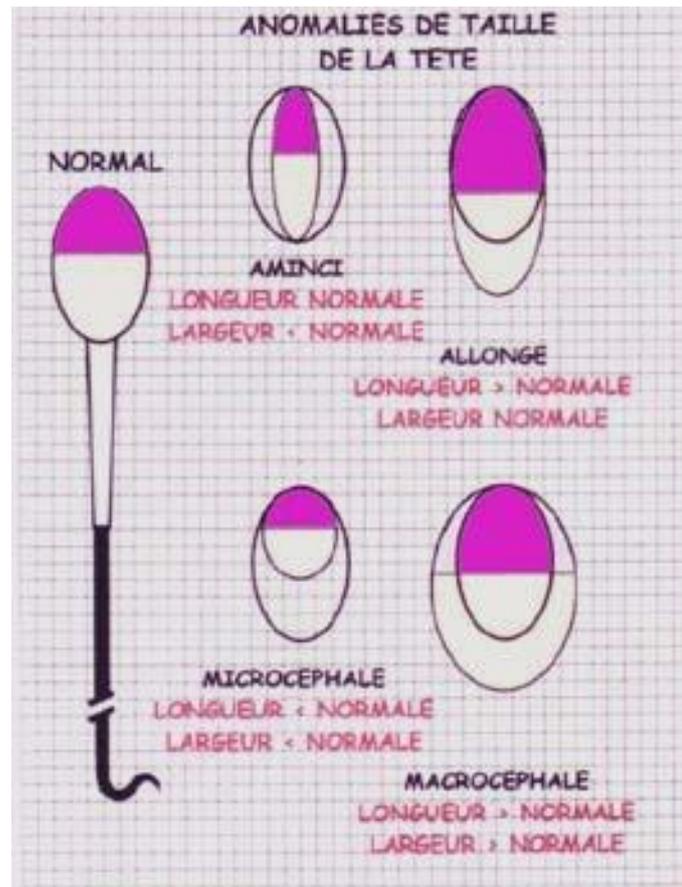


Figure 10 : Les anomalies de la taille de la tête des spermatozoïdes (AUGER J., EUSTACHE F.2000)

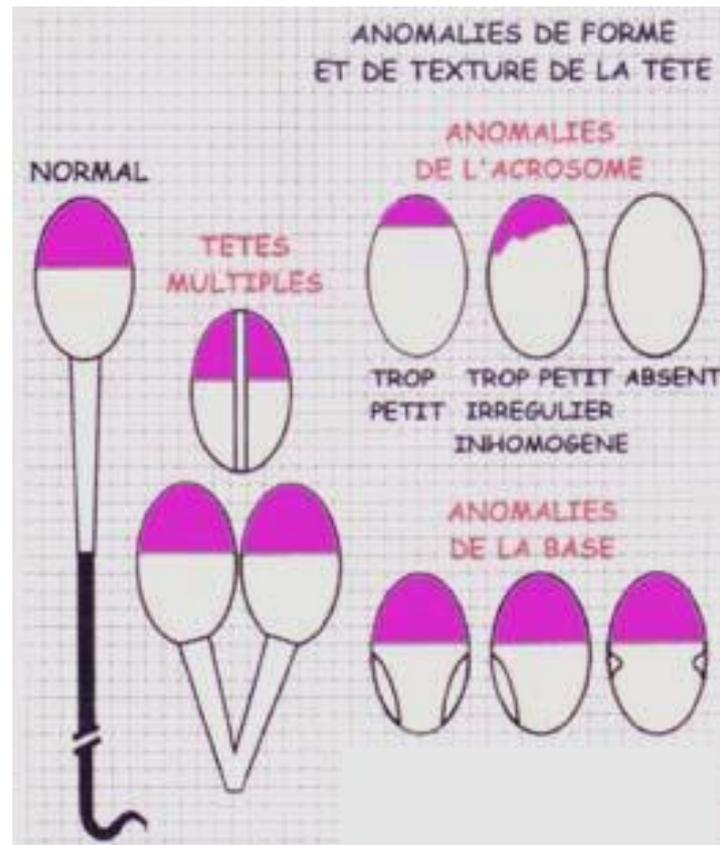


Figure 11 : les anomalies de la forme et texture de la tête des spermatozoïdes

(AUGER J., EUSTACHE F.2000)

❖ **Trois anomalies de la pièce intermédiaire : (Fig. 11)**

- **Le reste cytoplasmique** : est considéré comme anomalie s'il y a une surface supérieure au tiers de la surface d'une tête normale. Il se situe à la jonction de tête à la pièce intermédiaire.
- **Pièce intermédiaire grêle** : correspond à une gaine mitochondriale qui ne s'est pas constituée.
- **Pièce intermédiaire enroulée** : la pièce intermédiaire et l'axe de la tête forment un angle net.

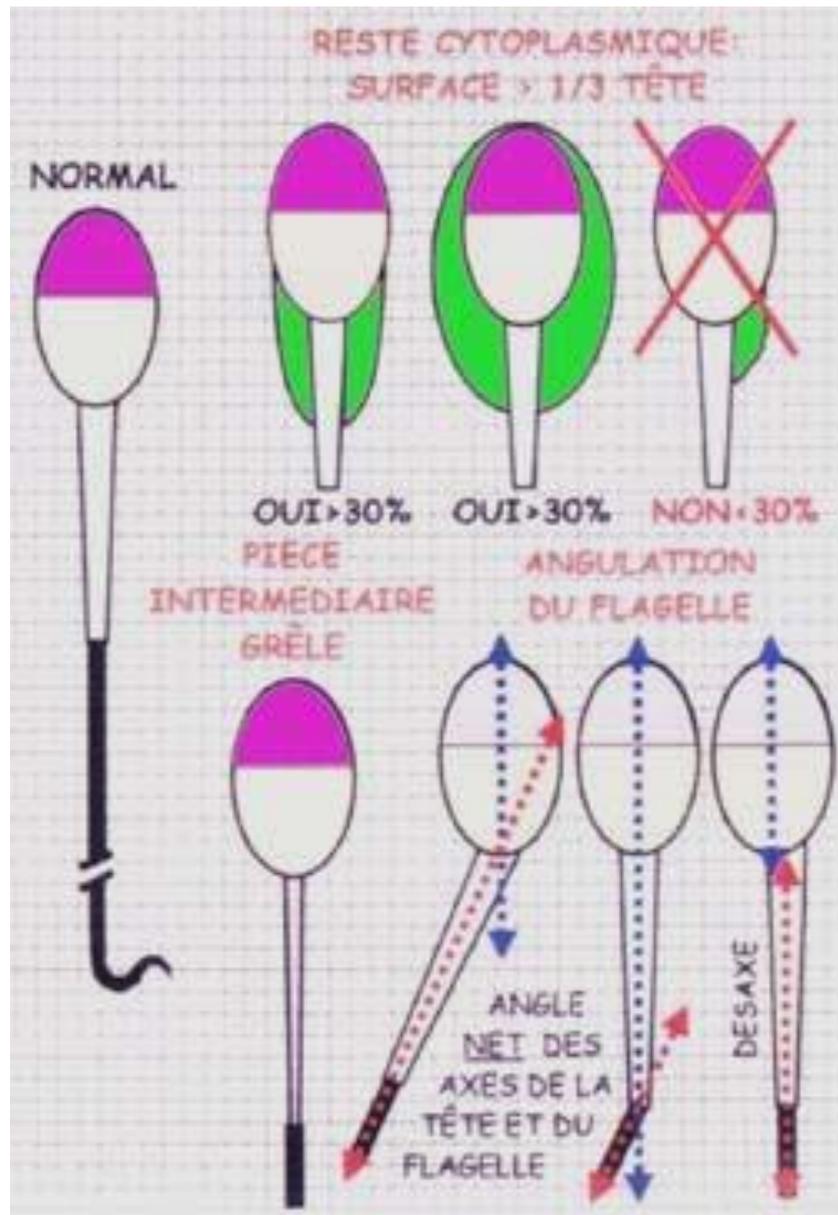


Figure 12 : les anomalies de la pièce intermédiaire (AUGER J., EUSTACHE F.2000)

□ Cinq anomalies du flagelle : (Fig. 12)

- **Flagelle absent** : ou la pièce connective est rudimentaire.
- **Flagelle court** : flagelle inférieur à cinq fois la longueur de la tête.
- **Flagelle irrégulier** : quand le diamètre du flagelle est variable, présentant des rétrécissements ou élargissement.
- **Flagelle enroulé** : flagelle enroulé autour de la tête ou en dehors de la tête.
- **Flagelle multiple** : il y a plus d'un flagelle par spermatozoïde, la pièce intermédiaire étant commune ou multiple.

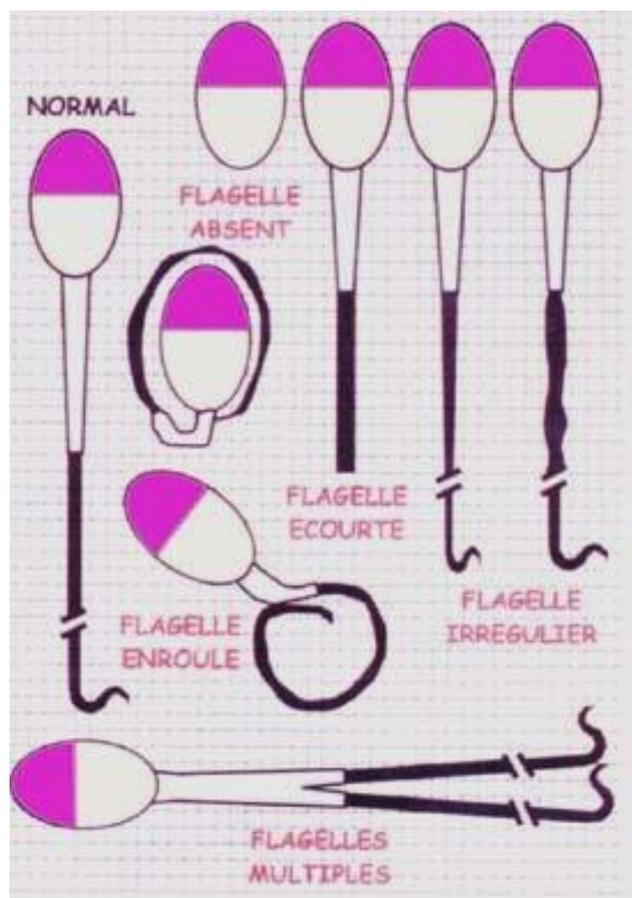


Figure 13 : les anomalies du flagelle (AUGER J., EUSTACHE F.2000)

Toutes ces anomalies (tête, pièce intermédiaire, flagelle) sont classées dans la grille de lecture sauf les spermatozoïdes en lyse et flagelles isolés ne sont pas classés mais leur fréquence est évaluée au compte des spermatozoïdes anormaux et normaux. Après avoir recensé toutes les anomalies de la grille de lecture, il a été décidé de faire figurer systématiquement l'index d'anomalies. Multiples (IAM) qui n'est autre qu'une application directe du système original à entrer multiple de la méthode de David. L'IAM est le rapport du nombre total d'anomalies recensées au nombre des spermatozoïdes anormaux. Il est l'indicateur du nombre moyen d'anomalies associées par spermatozoïdes anormaux. A partir de l'IAM on peut poser le diagnostic de la fertilité masculine. La valeur normale pour certains auteurs est inférieure à 1,6. L'analyse morphologique des spermatozoïdes en microscopie électronique permet de déterminer avec précision et de quantifier les structures anormales. Elle est un outil de diagnostic et de pronostic dans l'infertilité masculine. Son indication se fait en cas :

□ **Tératozoospermie sévère monomorphe et stable :**

La tératospermie est dit monomorphe, lorsque la totalité ou la majorité des spermatozoïdes anormaux présentent la ou les mêmes anomalies. Les anomalies les fréquentes de la tératospermie monomorphe sont :

Spermatozoïdes décapités (spermatozoïdes avec des têtes dépourvues de flagelles) ; les globozoospermies (spermatozoïdes à tête ronde sans acrosome) ; spermatozoïdes a flagelle court ou irrégulier ; spermatozoïdes macrocéphales. A noter que les spermatozoïdes macrocéphales, les globozoospermies, spermatozoïdes à flagelles courts peuvent être détectés à la microscopie optique. La globozoospermie est caractérisée par une absence d'élongation du noyau, d'acrosome et du feuillet post acrosomique.

Les spermatozoïdes décapités se caractérisent par l'absence de la fossette d'implantation et de la plaque basale. Le flagelle court se voit en microscopie électronique comme des anomalies d'arrangement des composantes de la gaine fibreuse.

□ Altération partielle ou totale de la mobilité et la qualité du mouvement des spermatozoïdes :

Elle est causée par les anomalies flagellaires qui sont :

La dysplasie de gaine fibreuse présente une asthenospermie très importante. Au spermocytogramme le spermatozoïde présente un court flagelle, épais et de calibre irrégulier. Les anomalies en microscopie électronique sont : défaut d'arrangement des composants de la gaine fibreuse, désorganisation des colonnes longitudinales et des rayons transverses. La dyskinésie ciliaire primitive se définit comme le syndrome des cils immobiles. Les spermatozoïdes sont immobiles avec un flagelle rigide et ont une morphologie normale au microscope optique. La microscopie électronique décrit une absence des bras de dyneine internes et ou externes sur des doublets périphériques, absence des microtubules centraux.

- Les normes du spermocytogramme selon l'OMS

Tableau 4 : Les normes du spermocytogramme selon l'OMS ;1993

Paramètres	Valeurs
Morphologie normale	> 30%
Morphologie anormale	< 50%
Têtes anormales	< 35%
Pièces intermédiaires anormales	< 20%
Flagelles anormaux	< 20%
Forme doublée	< 10%

5. Récolte de la semence de chien

Nous n'envisagerons pas dans ce paragraphe la récolte de la semence épидидymaire, qui se réalise après une orchidectomie ou après la mort de l'animal.

5.1. Récolte manuelle

Il s'agit de la méthode la plus employée puisqu'elle est simple, rapide (2 à 5 minutes) et efficace. La plupart des publications sont univoques sur la technique à utiliser et ce qui suit constitue un résumé des références bibliographiques suivantes : JOHNSTON (1991), LINDE-FORSBERG(1995), FRESHMAN (2002), FELDMAN et NELSON (2004a) et KUTZLER (2005).

5.1.1 Environnement

La récolte doit s'effectuer dans un environnement calme, en évitant toute perturbation ou tout stress pour l'animal. Le nombre de personnes présentes doit être réduit au minimum et la présence du propriétaire peut être indispensable, indifférente ou à éviter selon les animaux.

La présence d'une femelle, de préférence en chaleurs, n'est pas toujours nécessaire mais peut permettre de faciliter la récolte et d'obtenir un sperme de meilleure qualité.

Idéalement, une femelle connue du mâle doit être utilisée.

Si la femelle n'est pas en chaleurs, il est possible d'utiliser des phéromones de synthèse de femelle en chaleurs (méthyl p-hydroxybenzoate) ou des sécrétions vaginales de femelle en chaleurs, conservées congelées sur des compresses, qui seront déposées sur la vulve de la chienne.

Cette dernière doit être maintenue en position debout avec présentation de la vulve au mâle. Si elle s'avère peu coopérative, elle doit être muselée.

5.1.2 Matériel

Le matériel nécessaire se compose, en général, de trois tubes stériles gradués sur lesquels sont placés trois cônes en plastique souple ou vagins artificiels (voir photographies 1 et 2). Chaque ensemble est utilisé pour récolter chacune des trois phases de l'éjaculat.

Les tubes stériles gradués à usage unique sont préférables puisqu'ils n'ont pas besoin d'être stérilisés et qu'ils ne contiennent aucun résidu.

Les cônes en plastique présentent l'intérêt d'être traumatiques et réutilisables. Entre chaque utilisation, il convient de les nettoyer, les désinfecter, les rincer abondamment (les désinfectants étant spermicides) et les laisser sécher (l'eau étant également

spermicide). Leur principal inconvénient est le risque de contamination par le prépuce, qui doit être minimisé en respectant le protocole présenté ci-après.

Avant utilisation, les cônes et les tubes doivent être réchauffés à 37°C pour le confort de l'animal et pour éviter aux spermatozoïdes un choc thermique trop important.



Photographie 1. Ensemble tube stérile gradué et cône en plastique souple utilisé pour récolter chaque phase de l'éjaculat (Cliché CERCA).



Photographie 2. Matériel nécessaire à la récolte de la semence canine (Trois tubes stériles gradués et leur cône en plastique placés dans un porte-tube métallique conservant la chaleur) (Cliché CERCA)

5.1.3 Technique

Avant la récolte, il est utile de faire uriner l'animal afin de minimiser le risque de contamination du sperme par l'urine. La récolte se pratique le plus souvent au sol, le manipulateur se plaçant à genoux à côté du chien. Pendant que celui-ci s'intéresse à la femelle, le manipulateur commence à masser énergiquement les bulbes érectiles à travers le prépuce. Lorsque le pénis et les bulbes érectiles commencent à enfler, la verge est décalottée jusqu'en arrière des bulbes érectiles.

Le manipulateur exerce alors une striction du pénis en arrière des bulbes érectiles avec le pouce et l'index d'une de ses mains et introduit le pénis dans le premier cône de l'autre main. Généralement, le chien présente des mouvements du bassin et commence à éjaculer la première phase. Lorsque les mouvements du bassin diminuent, le manipulateur doit changer de cône, tout en maintenant une pression en arrière des bulbes érectiles, car l'émission de la seconde phase débute. Le chien essaye alors de « descendre » du bras du manipulateur en levant un des postérieurs, il faut aider l'animal en ce sens et retourner le pénis à 180° vers l'arrière pour mimer le déroulement normal d'une copulation. Le manipulateur se place donc derrière l'animal pour récolter la fin de la seconde phase.

Le dernier changement de cône se fait lors du passage à l'émission de la phase prostatique qui est mis en évidence par une courte pause, par les contractions péniennes et par la production d'un liquide translucide. Il n'est pas utile de récolter la totalité de la troisième phase, celle-ci étant d'un volume important et émise sur un temps plus ou moins long.

Après la récolte, il faut vérifier que le pénis soit correctement recalotté avant de laisser partir l'animal ou de le remettre en cage afin de prévenir un éventuel paraphimosis ou des blessures péniennes.

Une autre technique consiste à récolter la première et la seconde phase dans le même tube et la troisième phase dans un deuxième tube. Cette technique est envisageable si le sperme est utilisé pour une insémination artificielle en semence fraîche ou si le sperme est centrifugé et le surnageant éliminé. En effet, les sécrétions prostatiques contenues dans la première et la troisième phases sont toxiques pour les spermatozoïdes (ROTA et al.1995 ;SIRIVAIIDYAPONG et al., 2001 ; TSUTSUI et al., 2003).

Les tubes contenant la semence doivent être maintenus à 37°C ou, à défaut, à température ambiante en attendant l'analyse du sperme et son utilisation.

6. Evaluation de la vitalité

L'évaluation de la vitalité consiste à déterminer le nombre des cellules vivantes et mortes après dénombrement d'un minimum de 100 spermatozoïdes sur un frottis coloré avec une coloration spéciale (Eosin-nigrosine, à fluorescence). Les cellules vivantes apparaissent non colorées et la mortes colorée en rose par l'éosine-nigrosine (FONTBONNE, 1995).

7. L'analyse informatique de la semence (CASA : computerzed Assisted Sperm Analysis) :L'analyseur informatique de la semence ou communément appelé le système CASA

Est une méthode microphotographique. Il consiste en un dispositif incluant un matériel d'enregistrement microphotographique et en un support informatique pour la reconstruction et l'analyse des trajets. Cette technique permet de générer un nombre considérable de paramètre obtenu grâce à l'analyse individuelle de chaque spermatozoïde (MaoJ,WuGM,PratherRS,Smith MF,Cantley T,Rieke A,Didion BA,Day BN,2005).

Cette technique permet donc de réaliser des analyses objectives et précises sur la proportion de spermatozoïdes mobiles et leur mouvement (Blanch E,TomasC,Mocé ML,viudes de castro MP, Vicente JS,mocé E,2008).

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

En 2001, Iguer ouada et verstegen ont validé pour la première le système d'analyse informatique SCA : Sperm Class Analyzer – version 3.2.0 fabriqué par Microptic SL, Barcelona, Spain pour l'analyse de la semence canine. Ce système ses avéré d'une bonne précision dans l'analyse du sperme canin à condition d'être utilisé avec les bonne spécifications techniques recommandées dans cette étude (JOHNSTON S.D., ROOT KUSTRITZ M.V., OLSON P.N.S. (2001))

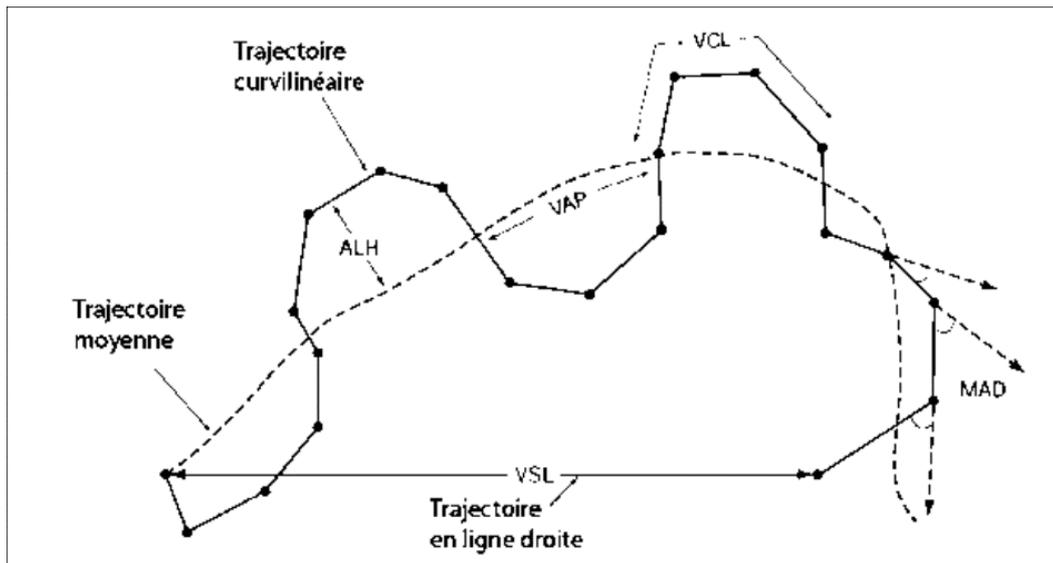


Figure 14 : les différents paramètres qui évaluent la mobilité spermatique (OMS., WHO.2010).

1. Objectifs

Les objectifs du présent travail sont :

- l'automatisation de l'analyse de la morphologie du sperme canin par le système sperm class analyser « SCA ».
- La détermination de la méthode de coloration la plus adaptée à la morphométrie du spermatozoïde canin par le système « SCA ».

Nous précisons que :

Les produits chimiques, les réactifs et les colorants utilisés dans notre travail sont mis à notre disposition à titre gracieux par le **Centre Nationale d'Insémination Artificielle et d'Amélioration Génétique (CNIAAG)** de Baba Ali. Cette collaboration s'insère dans le cadre d'une convention entre le CNIAAG et le Laboratoire des Biotechnologies liées à la Reproduction Animale (LBRA) de l'Université de Blida1.

Les équipements de recherche et le matériel de laboratoire utilisés dans ce travail appartiennent au **Laboratoire des Biotechnologies liées à la Reproduction Animale (L.B.R.A)** de l'Université de BLIDA1.

1 .1. Matériel

Pour la réalisation du spermogramme et spermocytogramme, le laboratoire disposait de différents matériels qui sont :

- Un microscope optique avec des objectifs à contraste de phase ;
- SCA « Système class analyser » « CASA »
- Des gants stériles ;
- Des lames et lamelles pour l'étalement ;
- Les pipettes de 1000µl, 100 µl ,50µl ,20µl ;
- les cellules de Malassez pour la numération des spermatozoïdes ;



Figure15 : matériel utilisé au laboratoire (LBRA)

- Le Spermlue et le Diff-Quik (fig.16) utilisé pour la coloration des frottis pour analyse Morphologique des spermatozoïdes très sensible pour la reconnaissance de l'acrosome, de la région post acrosomique, la pièce intermédiaire, le flagelle.
- Le Diff-Quik se compose de : Fixateur I, Colorant II et Colorant III.
- Spermlue se composé de Fixateur I et Colorant II.



Figure 16 : les colorants utilisés pour l'analyse morphologique des spermatozoïdes (photos personnel).

1.2. Matériel Biologique

1.2.1. Animaux

Pour réaliser l'ensemble des expériences, nous avons utilisé la semence de 04 chiens. Nous avons prélevé huit (10) éjaculats à partir de quatre (04) chiens différents récoltés à 72 h d'intervalle minimal. Les chiens utilisés pour notre expérimentation sont, un chien Berger allemand de 5 ans (Bob), un chien Rottweiler de 2 ans (Willis), un chien Staff Américain de 2 ans (Enzo), un chien Braque français (Roki). Tous les chiens ayant servi à la récolte étaient en bonne santé et de fertilité confirmée par leurs propriétaires. (figure17).



a : Willis

b : Bob

Figure17 : chiens expérimentales

Tableau 5 : identification de chaque animal.

Pour chaque animal, le nom, la race, l'âge, le statut de fertilité et le numéro de l'expérience pour laquelle la semence a été utilisée sont répertoriés dans un tableau

Nom	Race	Age	fertilité
WILLIS	Rottweiler	2ans	inconnue
ENZO	Berger Allemand	3ans	+++
ROKI	Braque Français	4ans	+++
BOB	Staff Américain	2ans	++

2. METHODES

2.1. Récolte de la semence

Pour notre expérience, nous avons récolté la semence de chaque animal manuellement, selon la technique décrite dans la première partie de notre thèse, en récupérant dans un même tube la première et la seconde phase de l'éjaculat(Annexe). Avant utilisation, nous avons réchauffé les tubes et les cônes dans une étuve et nous avons maintenus à une température de 37°C. à

l'aide d'un porte-tube métallique réchauffé dans l'étuve. Nous n'avons jamais prélevé plus de 03 chiens en même temps afin que le traitement de la semence, avant l'équilibration ou la réfrigération, soit le plus rapide possible. Lorsque nous avons récolté plusieurs fois la semence d'un même animal, nous avons effectué les prélèvements au minimum à 48 heures d'intervalle. (Figure18).



Figure 18 : Etuve utilisé pour l'incubation de solutions préparées (photo personnel)

2.2. Les étapes de récolte

La tête du chien est maintenue par le propriétaire et orientée vers l'arrière des bulbes, retrait du fourreau et application d'une pression en arrière des bulbes.

Après la récolte, le chien est promené plusieurs minutes afin de faciliter la récolte de sperme 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(Figure19).

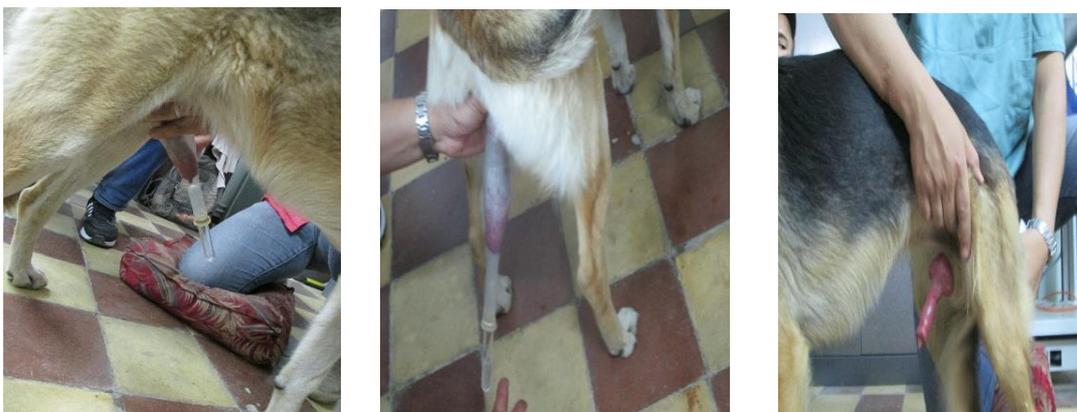


Figure 19 : Début de la récolte -Orientation caudale du pénis -fin de récolte. (Photos personnel)

2.3. Examen de la semence

Pour chaque expérience, nous avons examiné la semence de chaque animal avant de l'utiliser. Les différentes évaluations ont toujours été effectuées par le même opérateur afin de limiter les biais liés à la subjectivité des techniques employées.

Nous avons tout d'abord mesuré le volume des deux premières phases recueillies ensemble. Puis, nous avons évalué la mobilité en déterminant, subjectivement, le pourcentage de spermatozoïdes mobiles fléchant, par observation au microscope, muni d'une platine chauffante à 37°C, d'une goutte de semence (10 µL) déposée entre lame et lamelle. (Annexe) :

Nous avons ensuite estimé le nombre de spermatozoïdes présents dans la phase spermatique de l'éjaculat en utilisant une cellule hématimétrique de Thoma (Figure 20). Pour ce faire, nous avons dilué 10 µL du mélange des deux premières phases avec 990 µL d'une solution de NaCl à 4 % afin d'obtenir une dilution au 1/100ème. Nous avons déposé une goutte de cette semence diluée sur la cellule de Thoma et nous avons compté le nombre de spermatozoïdes présents dans les 4 carrés extérieurs et dans un des carrés intérieurs. Nous avons ensuite extrapolé ce nombre à l'éjaculat selon la formule suivante :

Nombre de spermatozoïdes présents dans l'éjaculat (en millions) = Nombre de spermatozoïdes dénombrés x 5 x volume (en ml) des deux premières phases (Annexe)

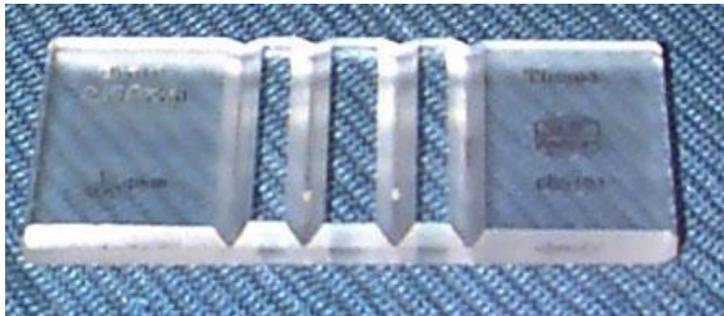


Figure 20: Cellule de Thoma. Elle permet le comptage de spermatozoïdes grâce à une grille graduée (photo CERCA).

2.4. Spermogramme

C'est l'étude des caractéristiques du sperme : couleur, odeur, viscosité, pH, volume, vitalité, mobilité, numération. Nous avons utilisé les normes de l'OMS.

2.5. Dilueur

Au cours de nos expériences, nous avons utilisé un dilueur (utilisés au CERCA en routine) : les compositions de ce dilueur est indiquée dans le tableau 6.

Tableau 6. Composition de diluer

	Les valeurs	Dilueur
TRIS	3,025 g	3,025 g
Acide citrique	1,7 g	1,7 g
Fructose	1,25 g	1,25 g
Pénicilline	0,08 g	0,08 g
Dihydrostreptomycine	0,1 g	0,1 g
Eau distillée Jusqu'à	77 ml	Jusqu'à 100 ml

Nous allons prendre à l'aide d'une micropipette 160µl de diluer et 40µl de la deuxième phase d'éjaculat de la semence canine, dans un tube ; ce dernier mélangé à l'aide d'un agitateur. (Figure21)

Figure 21 : préparation de la solution

3. Technique de coloration

3.1. Technique de Diff-quick®

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

3.2. Technique Spermbblue®

- ✓ Verser les différentes solutions Diff-Quik dans des cuvettes de coloration a couvercle ou tout autre récipient adéquat.

- ✓ 1-Préparer un frottis sur lame (10µl de sperme diluée) 10 µl à 15 µl si faible concentration ≤ 20 M/ml.
 - ✓ Laisser sécher Angle 45 ° à 20°.
 - ✓ Placer la lame verticalement dans la boîte de fixateur (Spermblye 1) , doucement et sans agiter la lame dans le fixateur laisser pendant 10 minutes (20 à 25 C°.).
 - ✓ Retirer doucement la lame de la boîte de fixateur et la garder à un angle de 60° à 80°.
 - ✓ **NB. Aucun rinçage n'est nécessaire avant colorant**
 - ✓ Placer doucement la lame en position verticale dans la boîte de coloration (Spermblye2) et laisser sans agiter la lame pendant deux phases de temps :
 - 10 à 15 minutes.
 - 20 à 25 minutes.
 - ✓ Après coloration , retirer doucement la lame et l'immerger dans l'eau distillée sans l'agiter pendant trois (03) secondes , puis la sortir et la plonger trois fois pendant une (01) seconde.
 - ✓ Laisser la lame à un angle de 70° sur un papier jusqu'à un séchage complet.
 - ✓ Montage à la solution EUKITT®.
 - ✓ Laisser la solution durcir avant d'observer à un (Gr × 100) avec l'huile à immersion .
- 100 spermatozoïdes est observés Sur une lame de semence colorée par de Diff-quick et Spermblye par system class analyser «SCA» pour déterminé le pourcentage de spermatozoïdes normaux, anormaux et de ceux possédant une gouttelette cytoplasmique, une anomalie de la tête, du flagelle ou de la pièce intermédiaire. (Annexe)

4. Analyse statistique

Afin de vérifier les anomalies des spermatozoïdes testés et pour la comparaison entre les deux colorants (le Spermblye et le Diff-Quick). Nous avons utilisé le logiciel SYSTAT, ver.12, SPSS 2009, en déterminant la variance à l'aide du ANOVA, les différences ont été considérées significatives à $P \leq 0.05$ (Philippeau, 1989).

3. RESULTATS ET DISCUSSION

3.1 Résultats

3.1.1. Evaluation des spermatozoïdes de la semence canin

L'analyse de la variance des taux de spermatozoïdes qui présentent des anomalies a montré des différences hautement significatives chez le chien Willis (tableau 7)

Tableau 7 : Analyses statistiques des anomalies des spermatozoïdes chez WILLIS

Mode	Facteurs	Somme des carrés	d.f	Carrés moyens	F-ratio	P
Classification basique	colorant	45575.800	4	11393.950	385.582	0.000
temps	colorant	300.950	3	100.317	3.395	0.024
Classification *temps	colorant	12731.800	12	1060.983	35.905	0.000

En analyse de variance ANOVA, montre que le taux des anomalies des spermatozoïdes enregistrés au niveau de la tête a atteint les 62% (Figure21a ; Figure 21b) ; et 50% pour la pièce intermédiaire, 2% anomalie pour le reste cytoplasmique et les flagelle ne présente pas des anomalies 0% .les spermatozoïdes normaux enregistré les 40%.

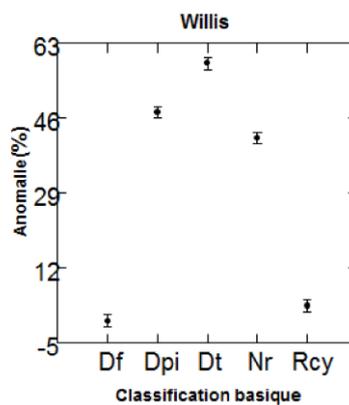


Figure21a .Analyse de la variance ANOVA des taux d'anomalie (%) chien Willis

Analyse de variance ANOVA ; montre que les anomalies apparu mieux à l'égard du Diff-Quik® et avec un pourcentage de 82% en comparaison avec le Spermblye® ou on a enregistré les 60%

(Figure21b.)

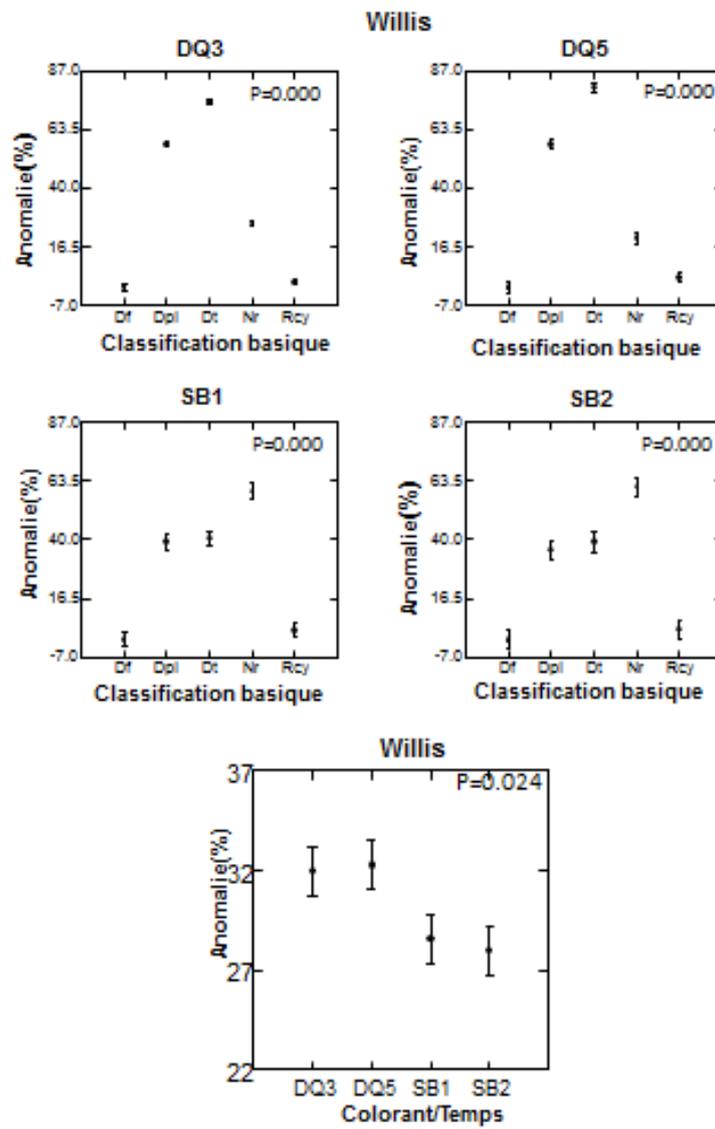
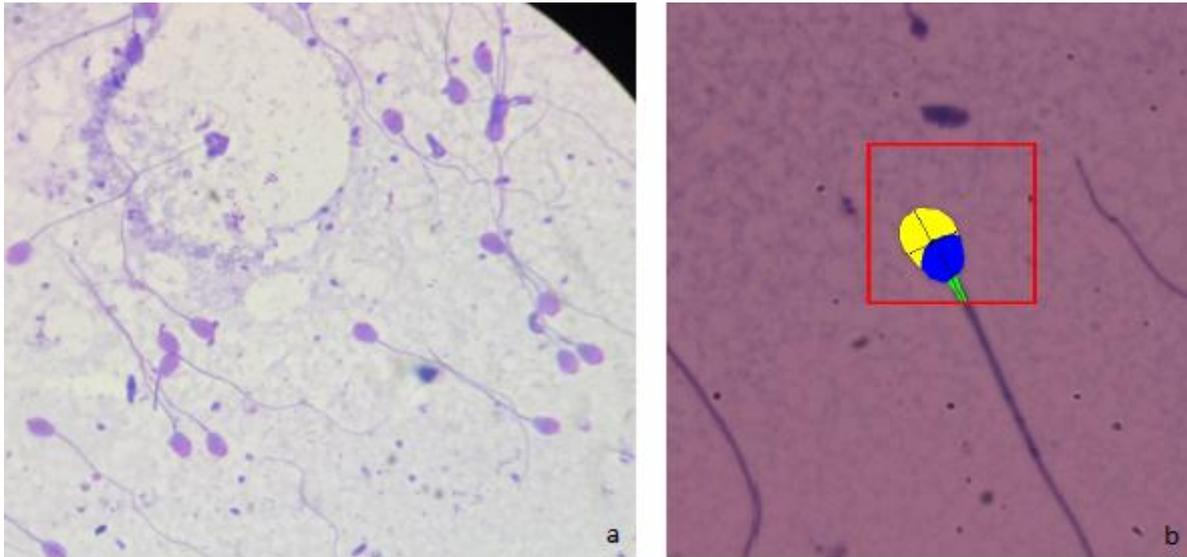
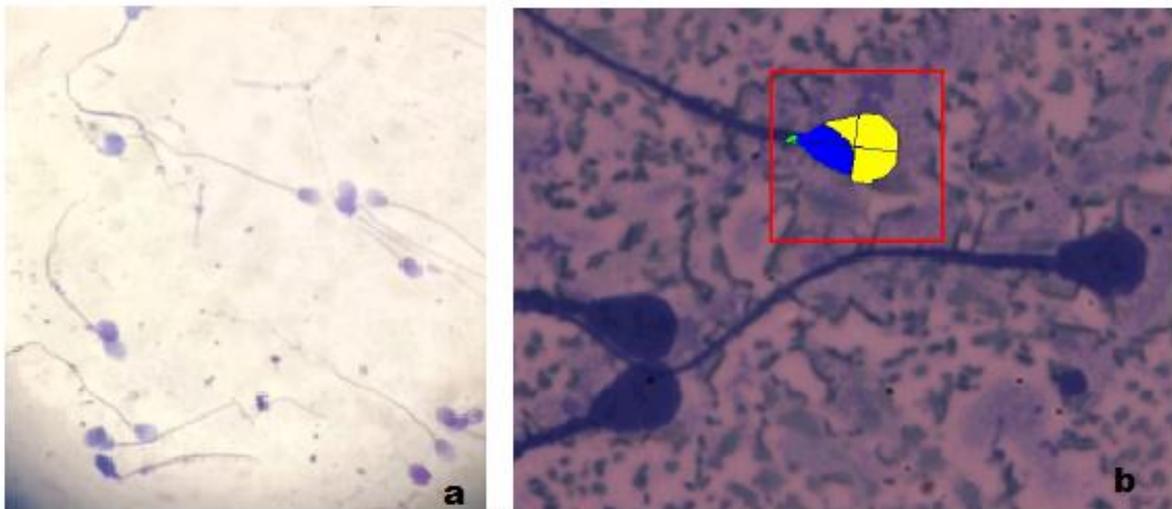


Figure21b. Analyse de la variance ANOVA des taux d'anomalie (%) selon le colorant.



a. photo prise par microscope optique

b. photo prise par le SCA par le Diff-Quik



a. photo prise par microscope optique

b. photo prise par le SCA par le Sperme Bleu

Figure21c. Spermatozoïdes avec une anomalie au niveau de la tête chez le chien Willis

L'analyse de la variance des taux de spermatozoïdes qui présentent des anomalies à montrer des différences hautement significatives chez le chien Enzo (tableau8)

Tableau 8 : Analyses statistiques des anomalies des spermatozoïdes chez Enzo

Mode	Facteurs	Somme des carrés	d.f	Carrés moyens	F-ratio	P
Classification basique	colorant	40211.675	4	10052.919	114.847	0.000
temps	colorant	433.900	3	144.633	1.652	0.187
Classification *temps	colorant	14047.225	12	1170.602	13.373	0.000

En analyse de variance ANOVA, le taux des anomalies des spermatozoïdes enregistrés au niveau de la tête ont atteint les 55% ; et 39% pour la pièce intermédiaire, 2% anomalie pour le reste cytoplasmique et les flagelle ne présente pas des anomalies 0% .les spermatozoïdes normaux enregistré les 46%. (Figure22a).

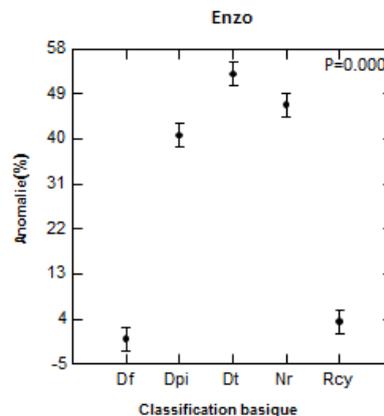


Figure22a .Analyse de la variance ANOVA des taux d'anomalie (%) chien Enzo

Analyse de variance ANOVA ; montre que les anomalies apparu mieux à l'égard du Diff-Quik® et avec un pourcentage de 82% en comparaison avec le Spermblue® ou on a enregistré les 60%

(Figure22b.)

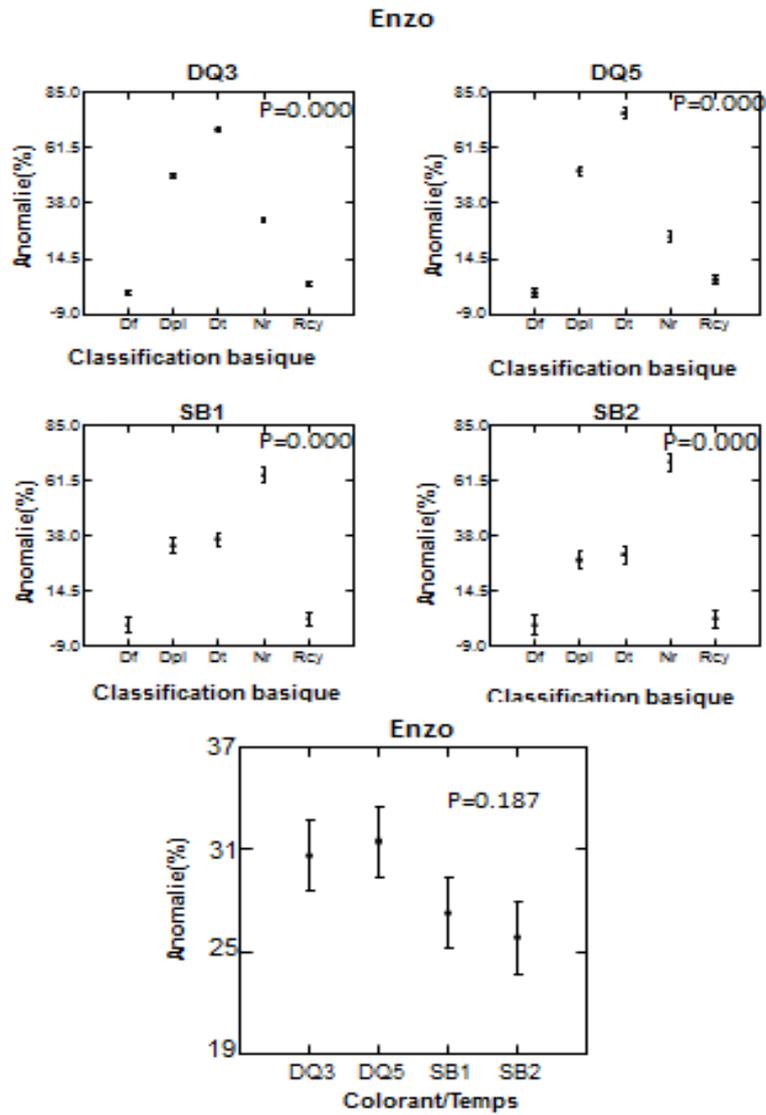
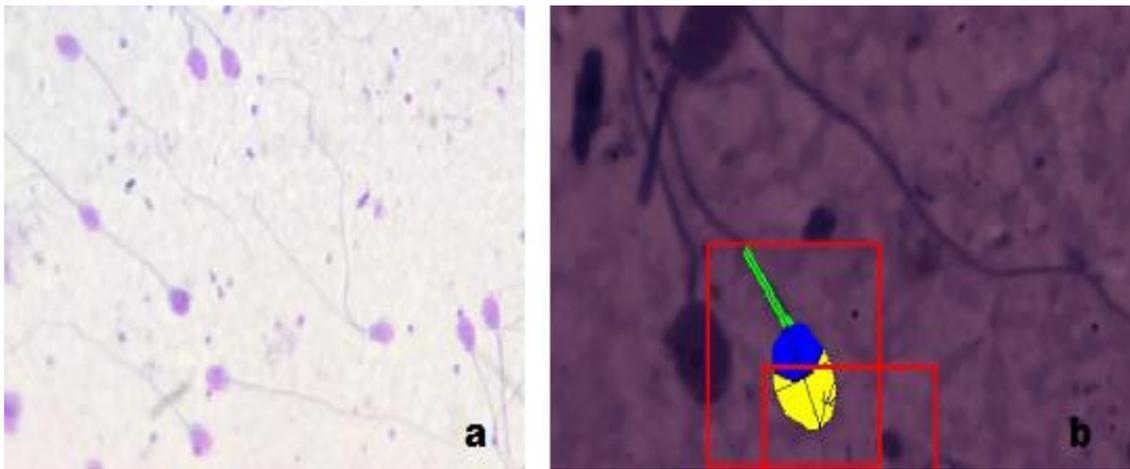
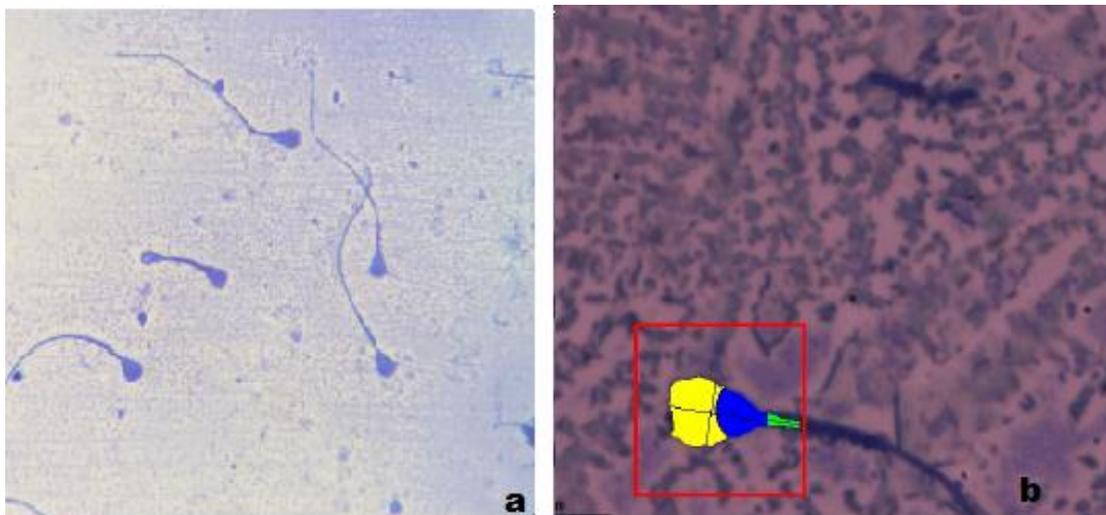


Figure 22b. Analyse de la variance ANOVA des taux d'anomalie (%) selon le colorant.



a. photo prise par microscope optique

b. photo prise par le SCA par le Diff-Quik



a. photo prise par microscope optique

b. photo prise par le SCA par le Sperme Bleu

Figure22c. Spermatozoïdes avec une anomalie au niveau de la tête chez le chien Enzo

L'analyse de la variance des taux de spermatozoïdes qui présentent des anomalies montrés des différences hautement significatives chez le chien Bob (tableau 9).

Tableau 9 : Analyses statistiques des anomalies des spermatozoïdes chez BOB

Mode	Facteurs	Somme des carrés	d.f	Carrés moyens	F-ratio	P
Classification basique	colorant	49726.550	4	12431.638	110503.444	0.000
temps	colorant	324.938	3	108.313	962.778	0.000
Classification *temps	colorant	3305.250	12	275.437	2448.333	0.000

En analyse de variance ANOVA, le taux des anomalies des spermatozoïdes enregistrés au niveau de la tête ont atteint les 34% ; et 32% pour la pièce intermédiaire, 1% anomalie pour le reste cytoplasmique et les flagelle ne présente pas des anomalies 0% .les spermatozoïdes normaux enregistré des taux élevé qui dépasse les 70%. (Figure23a).à cet effet le chien BOB ne contient pas des fortes anomalies des spermatozoïdes, donc on considère le chien BoB fertile.

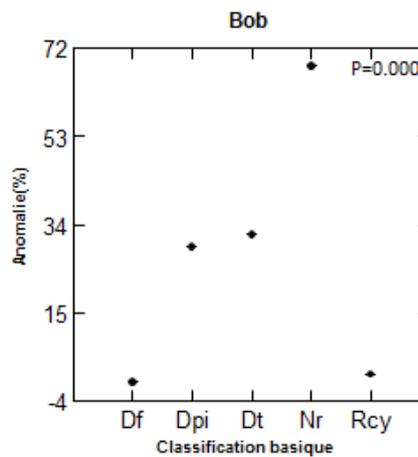


Figure23a. Analyse de la variance ANOVA des taux d'anomalie (%) chien Bob

Analyse de variance ANOVA ; montre que les anomalies apparus mieux à l'égard du Diff-Quik® et avec un pourcentage de 45% en comparaison avec le Spermblye® ou on a enregistré les 29% (Figure 23b.)

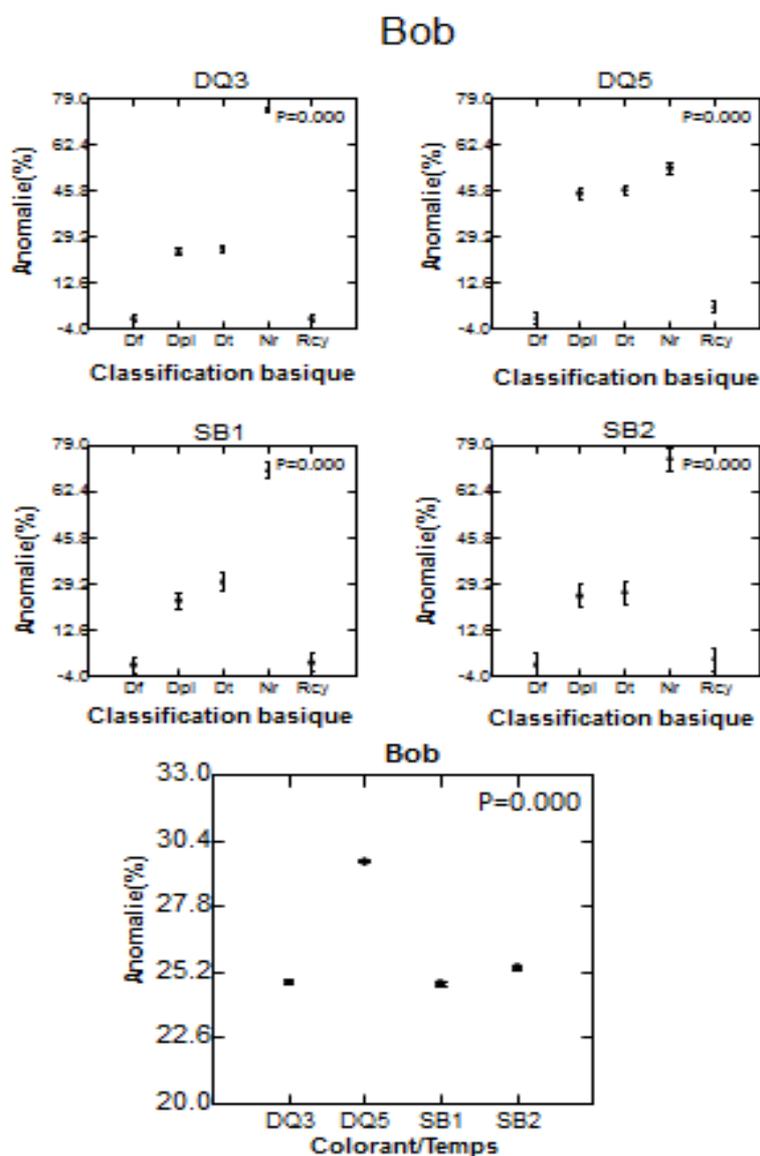
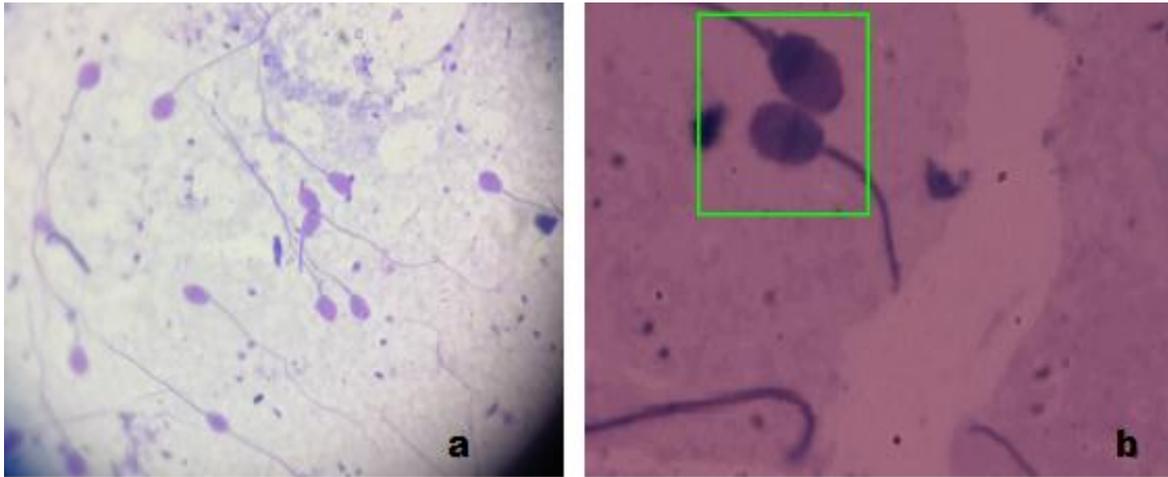
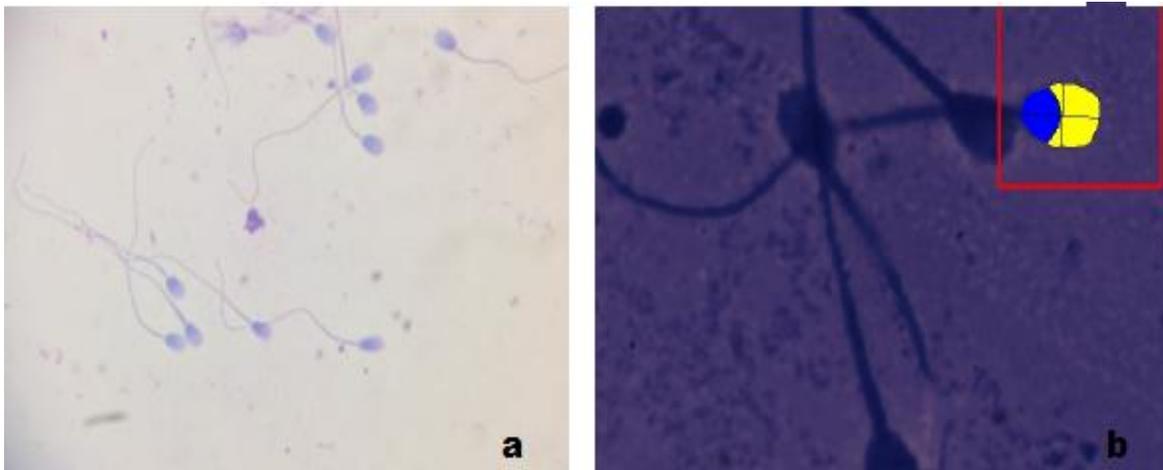


Figure 23b. Analyse de la variance ANOVA des taux d'anomalie (%) selon le colorant.



a. photo prise par microscope optique

b. photo prise par le SCA par le Diff-Quik



a. photo prise par microscope optique

b. photo prise par le SCA par le Sperme Bleu

Figure23c. Spermatozoïdes normaux et des spermatozoïdes avec une anomalie au niveau de la tête chez le chien Bob

L'analyse de la variance des taux de spermatozoïdes qui présentent des anomalies montrés des déférences hautement significatives chez le chien Roki (tableau10).

Tableau 10 : Analyses statistiques des anomalies des spermatozoïdes chez Roki

Mode	Facteurs	Somme des carrés	d.f	Carrés moyens	F-ratio	P
Classification basique	colorant	47154.000	4	11788.500	282924.000	0.000
temps	colorant	235.050	3	78.350	1880.400	0.000
Classification *temps	colorant	3135.200	12	261.267	6270.400	0.000

En analyse de variance ANOVA, montre que les spermatozoïdes normaux enregistré les taux les plus élevé avec un pourcentage de 70% ; où les taux des anomalies des spermatozoïdes enregistrés était moindre au niveau de la tête de 30% ; et 28% pour la pièce intermédiaire, 1% anomalie pour le reste cytoplasmique et les flagelle ne présente pas des anomalies 0%. (Figure24a).

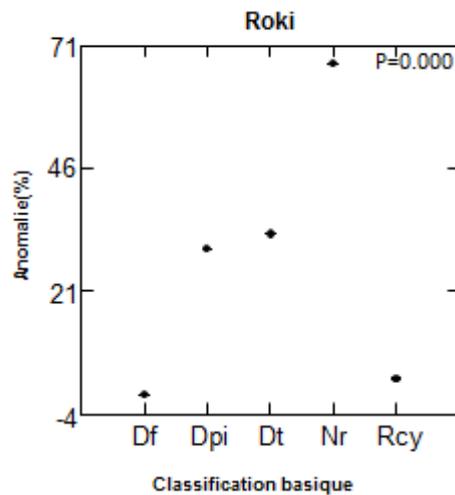


Figure24a .Analyse de la variance ANOVA des taux d'anomalie (%) chien Roki

Analyse de variance ANOVA ; montre que les anomalies apparus mieux à l'égard du diff- quik® et avec un pourcentage de 40% en comparaison avec le Spermblye® ou on a enregistré les 20%

(Figure24b.)

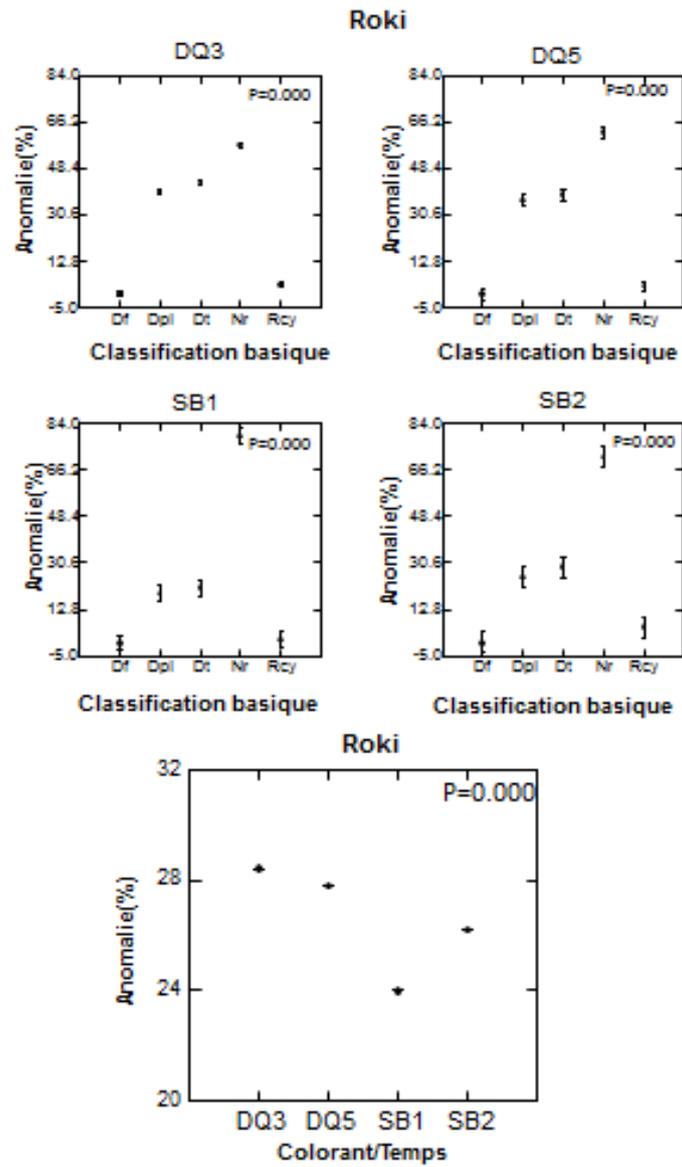
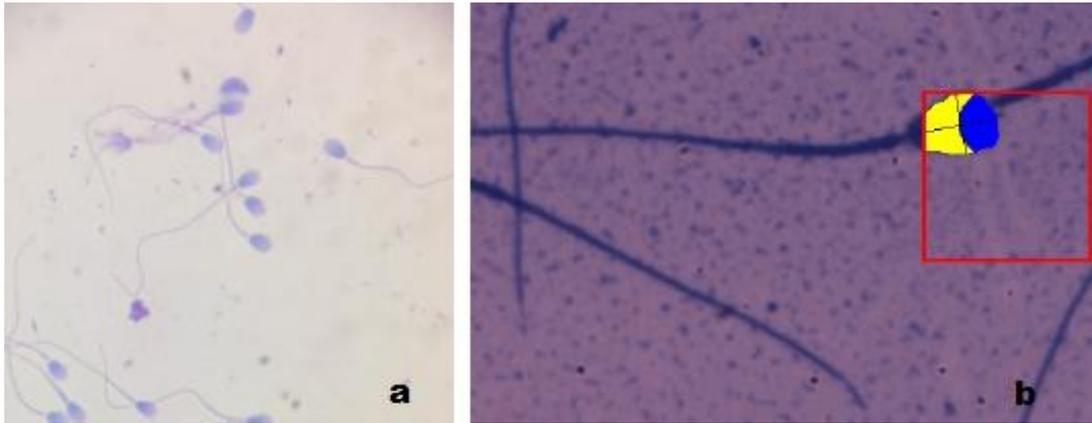
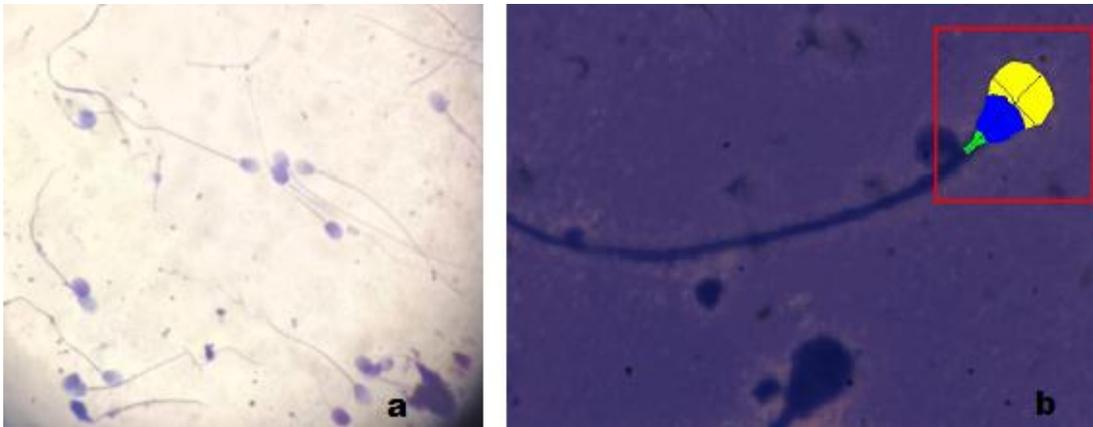


Figure 24b. Analyse de la variance ANOVA des taux d'anomalie (%) selon le colorant.



a. photo prise par microscope optique

b. photo prise par le SCA par le Diff-Quik



a. photo prise par microscope optique

b. photo prise par le SCA par le Sperme Bleu

Figure24c. Spermatozoïdes avec une anomalie au niveau de la tête chez le chien Roki

L'analyse de la variance des taux de spermatozoïdes qui présentent des anomalies à montrer des différences significatives chez les chiens (tableau11)

Tableau 11 : Analyses statistiques des anomalies des spermatozoïdes chez les chiens

Mode	Facteurs	Somme des carrés	d.f	Carrés moyens	F-ratio	P
Classification basique	colorant	161537.950	4	40384.488	317.831	0.000
Temps	colorant	983.284	3	327.761	2.580	0.054
Classification *temps	colorant	24433.575	12	2036.131	16.025	0.000

En analyse de variance ANOVA, le taux des anomalies des spermatozoïdes enregistrés au niveau de la tête ont atteint les 62% ; et 50% pour la pièce intermédiaire, 2% anomalie pour le reste cytoplasmique et les flagelle ne présente pas des anomalies 0% .les spermatozoïdes normaux enregistré les 40%. (Figure25a).

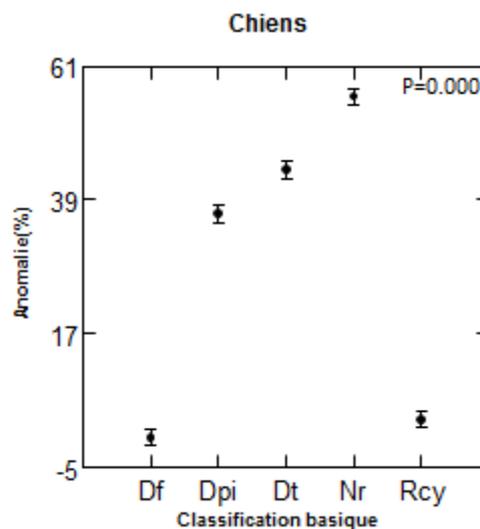


Figure25a. Analyse de la variance ANOVA des taux d'anomalies (%) chiens

Analyse de variance ANOVA ; montre que les anomalies apparu mieux à l'égard du Diff-Quik® et avec un pourcentage de 30% en comparaison avec le Spermblye® ou on a enregistré les 26%

(Figure25b).

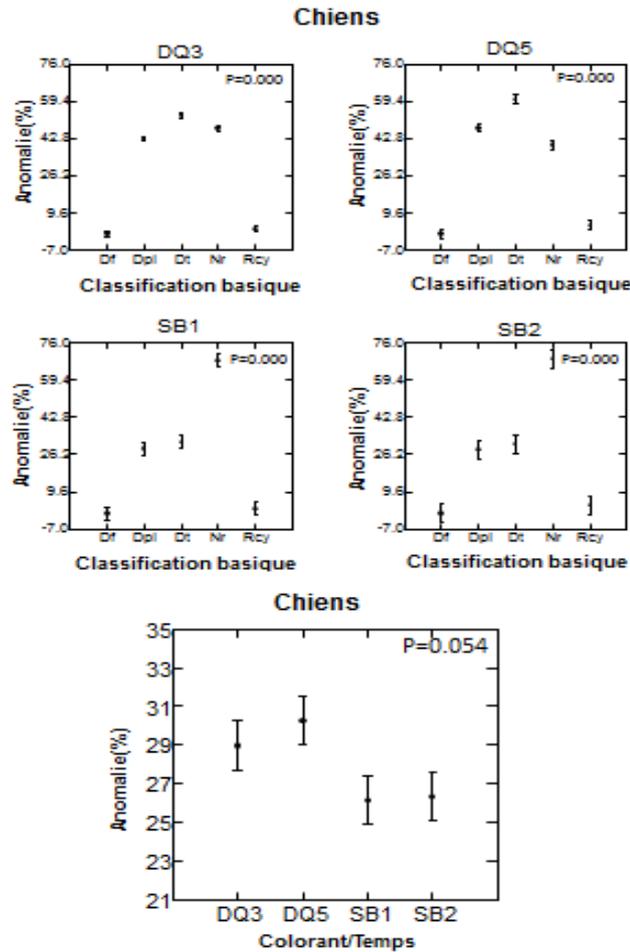


Figure 25b .Analyse de la variance ANOVA des taux d'anomalie (%) selon le colorant.

3.2. Discussion

L'analyse morphologique des spermatozoïdes a une importance indéniable pour prévoir la fécondité du sperme et dans l'exploration de la fertilité chez le mâle de manière générale.

Le spermocytogramme ou l'analyse classique de la morphologie est un examen qui requiert beaucoup de temps notamment avec la diversité des critères de classification.

Le recours à l'analyseur d'image pour une analyse informatique et automatisée de la morphologie (morphométrie) représente un intérêt certain en matière de temps, de précision et d'automatisation aussi bien dans les laboratoires d'analyse que ceux de recherche.

Un autre avantage de la morphométrie par analyse d'image (CASA) réside dans la possibilité de conserver les captures images d'un échantillon et de les réévaluer à nouveau

dans le cadre d'une démarche d'assurance qualité ou une expertise légale ou alors tout simplement en vue de modifier les critères de classification de la morphologie ou les paramètres techniques de l'analyseur d'image.

Il existe plusieurs systèmes d'analyse d'image (CASA : Computer Aided Sperm Analysis) dont le système Sperm Class Analyser (SCA®, Evolution v.6.2, Microptics, Spain) qui a été utilisé dans le présent travail.

Cet analyseur d'image (SCA®) a été déjà validé pour l'analyse des paramètres de mobilité en semence canine par DORADO et ses collaborateurs en 2011. Cependant, aucune étude à notre connaissance n'a été effectuée avant notre travail pour valider le système SCA® en morphométrie ni en vue de choisir une coloration optimale dans cette espèce.

En effet, la problématique de la morphométrie réside dans le choix de la meilleure technique de coloration qui doit être différentielle permettant au système d'analyse d'image d'identifier les différentes parties du spermatozoïde (Tête, Acrosome, Noyau, Pièce Intermédiaire).

Ainsi, notre travail vise à optimiser l'analyse de la morphologie du spermatozoïde canin par le système « SCA : Sperm Class Analyser » en comparant deux techniques de coloration à savoir la coloration « Diff-Quik® » et la coloration « Sperm-Blue® ».

En semence équine, HIDALGO et ses collaborateurs (2005) ont étudié l'effet de la coloration sur la morphométrie par le système SCA® en comparant trois colorations (Diff-Quick, Hémacolor et Harris).

Dans cette étude (HIDALGO et al., 2005), la coloration Harris a été trouvée meilleure que la coloration Diff-Quick®. Nous ne pouvons comparer directement nos résultats à ceux de ces auteurs, car contrairement à eux et pour des raisons pratiques, nous ne voulions pas utiliser des colorations très lourdes et très contraignantes en matière de coût et de temps telles que les colorations d'Harris-Shorr et celle de Papanicolaou. Notre choix s'est orienté vers les colorations de commerce rapides et simples de réalisation. Ceci à notre sens s'adapte mieux aux conditions de travail des laboratoires d'analyse.

Par ailleurs, nous supposons que la modification effectuée par HIDALGO et ses collaborateurs dans la technique de la coloration Diff-Quick® en allongeant le temps

d'exposition au colorant jusqu'à 2mn aurait pu provoquer un excès de coloration en la rendant trop compacte et moins différentielle empêchant ainsi le système d'analyse d'image de différencier entre les différentes parties du spermatozoïde.

Certains auteurs (VON DER HORST et MAREE, 2009) ont trouvé la coloration Spermlblue® comme technique optimale et parfaitement adaptée à la morphométrie par le système SCA® de la semence humaine ainsi que celle de diverses espèces animales. Cependant, à notre connaissance, cette coloration (Spermlblue®) n'avait pas encore été évaluée en semence canine avant notre étude.

Nous avons varié la durée de contact des spermatozoïdes avec le colorant Spermlblue® (10-15mn vs. 20-25) en maintenant le temps de contact avec le fixateur (10mn) et les résultats étaient toujours en faveur du Diff-Quick®.

Comparé au Spermlblue®, le Diff-Quick® présente plusieurs avantages, à savoir la simplicité de la technique, la rapidité (5sec dans chacune des trois solutions), le moindre coût ainsi que la polyvalence car le colorant dérive de la coloration classique MGG (May-Grünwald Giemsa) et peut être ainsi utilisé pour colorer presque toutes les préparations de frottis sur lames.

Les résultats de la présente étude demeurent préliminaires et ce travail mérite d'être étendu vers d'autres techniques de coloration et sur un effectif plus important.

Il serait aussi intéressant d'améliorer dans une prochaine étude les performances techniques du système (Caméra) de telle manière que le cadre de capture puisse analyser la totalité du spermatozoïde et inclure ainsi les anomalies du flagelle dans la morphométrie.

Nous ne pouvons considérer cette étude comme une validation du système SCA® pour l'analyse automatisée de la morphologie en semence canine car la validation nécessite une approche comparative entre la morphométrie par SCA® et l'analyse classique de la morphologie. Il serait intéressant à l'avenir d'effectuer cette validation avec un nombre de répétitions significatif et de corriger éventuellement les paramètres techniques du système SCA® pour la morphométrie.

Conclusion

Dans le présent travail, nous avons montré que :

Le Système d'analyse d'image (SCA®, Evolution v.6.2, Microspics, Spain) peut être utilisé pour une analyse automatisée de la morphologie du spermatozoïde canin.

La coloration rapide Diff-Quick® a pu colorer les anomalies de la tête et de la pièce intermédiaire du spermatozoïde canin au moyen du système SCA® beaucoup mieux que la coloration Sperblue®.

Comparé au Sperblue®, le Diff-Quick® présente les avantages d'être simple de technique, rapide de réalisation et polyvalent.

Cette étude ouvre plusieurs perspectives à savoir :

Etendre la présente étude vers d'autres colorations pour tester leurs efficacités en morphométrie par le système SCA®.

Améliorer les performances techniques du système SCA® (Caméra) pour permettre au cadre de capture d'image de comprendre la totalité du spermatozoïde et inclure ainsi les anomalies du flagelle dans la morphométrie.

Procéder à une validation du SCA® avec une approche comparative entre l'analyse automatisée (SCA®) et l'examen classique (Microscopie) de la morphologie du spermatozoïde canin.

- **AMMAR-KESKES L., KALLEL N., BOUZID F., REKIK S., RBAI T. (1998).**, Animal Reproduction *Science*, **82-83**, 209-224p.
- **AUGER J., EUSTACHE F. (2000).**, Standardisation de la classification morphologique des spermatozoïdes humains selon la méthode de David modifiée. *Andrologie* N°4, 358-373p.
- **BARONE R. (1978).**, Anatomie comparée des mammifères domestiques. Tome 3, fascicule 2. Lyon : Vigot, 951 p.
- **Blanch E, Tomas C, Mocé ML, viudes de castro MP, vicente JS, mocé E, 2008** :effect of CLC and two diluents on boar sperm cryosurvival. In: Gomez E (ed.), joint international Meeting of AERA-BAS, GIJon, Spain. *Reprod domest Anim* 43, 71-72 (abstract p59)
- **BONDE J.P., ERNST E., JENSEN T.K et al. (1998)** Relation between semen quality and fertility: a population-based study of 430 first-pregnancy planners. *Lancet*, 352: 1172-1177p.
- **BRIFFAUT AS. (2007).**, Congélation de la semence canine : détermination de la combinaison optimale de quatre facteurs différents Thèse pour le doctorat vétérinaire.
- **BUE P. (1992)** Contribution à l'étude de la conservation d'une semence de chien pendant 48 h à +4°C : choix d'un milieu et influence du glycérol. Thèse Méd. Vét., Nantes, n°127, 81 p.
- **Burke, T. (1986)**, Small animal reproduction and infertility. A clinical approach to diagnosis and treatment. Philadelphia : Lea & Febiger. 408 p.
Caractéristiques cyto-morphologiques du sperme chez les hommes consultant pour infertilité du couple dans la région de Sfax. *Andrologie*, 8, N°3, 281-301p.
- **CLAVERT A , BOURGUIGNAT., SIEST J P., FERARD G. (1997).**, Enquête sur les pratiques du spermogramme en France. *Andrologie*, 443-449p.
- **DAVID G., BISSON JP., CZYGLIK F et al. (1975)** Anomalie morphologique des spermatozoïdes humains. 1) Proposition pour un système de classification. *J. Gyn. Obstet. Biol. Reprod.*, 4, suppl. I : 17-36p.
- **Dorado J et al ; 2001 Verstegen J.P., Iguer-Ouada M., Onclin K., 2002.** Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology* .57:149-79.
- **EGGERT-KRUSE W., SCHWARZ H., ROHR G et al. (1996).**, Sperm morphology assessment using strict criteria and male fertility under in vivo conditions of conception. *Hum. Reprod.*, 11:139-146p.

- **FELDMAN E. et NELSON R. (2004a)**., Clinical and diagnostic evaluation of the male reproductive tract. In : Canine and feline endocrinology and reproduction. 3rd ed. Philadelphia : WB Saunders, 930-952p.
- **FONTBONNE A. (1995)**., Infécondité du chien mâle. In : encyclopédie vétérinaire .Pathologie de la reproduction. Elviesier, Paris, Volume 5,1-13.
- **FONTBONNE A. et BADINAND F. (1993a)**., Studies on freezing dog spermatozoa : effect of glycerol on motility after thawing. Journal of Reproduction and Fertility , 47 (suppl), 531-532p.
- **FONTBONNE A. et BADINAND F. (1993b)**., Canine artificial insemination with frozen semen : comparison of intravaginal and intrauterine insemination of semen. Journal of Reproduction and Fertility , 47 (suppl), 325-327p.
- **FONTBONNE A., DUMONT C. (1992)** ., Prélèvement et examen de la semence chez le chien. In : Pages J.P. (eds.).Les indispensables de l'animal de compagnie. Reproduction du chien et du chat. PMCAC Edition, Paris, 251-260p.
- **FRESHMAN J. (2002)** ., Semen collection and evaluation. Clinical Techniques in Small Animal Practice, 17, 104-107p.
- **GENEVIÉVE GRIZARD., CLÈMENTI JIMÉNEZ. (1997)** ., Les examens du sperme dans l'exploration de la fertilité masculine. Progrès en Urologie 7, 496-504p.
- **JEULIN C., FENEUX D., SERRES C et al. (1986)** ., Factors related to failure of human in vitro fertilization. J. Reprod. Fertil., 76: 735-744p.
- **JOHNSTON S. (1991)** ., Performing a complete canine semen evaluation in a small animal hospital. Veterinary Clinics of North America : Small Animal Practice, 21, 545-551p.
- **JOHNSTON S.D., ROOT KUSTRITZ M.V., OLSON P.N.S. (2001)** Semen Collection, Evaluation, and Preservation. In : Johnston S.D. (eds.). Canine and feline theriogenology. W.B. Saunders
- **JOUANNET., DUCOT B., FENEUX D., SPIRA A,(1988)** ., Male factors and the likelihood of pregnancy in infertile couples. I. Study of sperm characteristics. Int. J. Androl., , 11: 379-384p.
- **KRUGERT T F., A COSTA B., A A., SIMMONS K F et al. (1998)** ., Predictive value of abnormal sperm morphology in vitro fertilization. Fertil. Steril., 49.112-117p.
- **KUTZLER M. (2005)** ., Semen collection in the dog. Theriogenology, 64, 747-754p.

- **LINDE-FORSBERG C. (1995)** ., Artificial insemination with fresh, chilled extended, and frozen-thawed semen in the dog. *Seminars in Veterinary Medicine and Surgery* , 10, 485-8p.
- **Mao J, Wu GM, Prather RS, Smith MF, Cantley T, Rieke A, Didion BA, Day BN, 2005**: effect of methyl beta cyclodextrin treatment of pig spermatozoa on in vitro fertilization and embryo development in the absence or presence of caffeine *Theriogenology* 64, 1913-1927.
- **MIALOT JP. (1984)** ., Pathologie de la reproduction chez les carnivores domestiques . Maisons-Alfort : Editions du Point Vétérinaire, 192 p.
- **Oettle, (1993)** ., Sperm morphology and fertility in the dog. *Journal of Reproduction and Fertility* , Suppl. **47**, 257-260p.
- **O.M.S. (1993)** ., Manuel pour analyse du sperme humain et l'interaction des spermatozoïdes avec le mucus vaginal Editions INSERM, Paris 1993.
- **O.M.S. (2004)** ., présentation de l'infertilité. **Serono 2003-2004, P 1-2.**
- **O.M.S., 2010.** WHO laboratory manual for the Examination and processing of human semen , 5^{ème} édition.
- **OTT R., GOFFAUX M. et THIBIER M. (1987)** ., Examen morphologique des spermatozoïdes. *Elevage et Insem.* , 221, 15-20p.
- **Peña Martinez, (2004)** ., Canine fresh and cryopreserved semen evaluation.
- **Philippeau, 1989** ; les différences ont été considérées significatives à $P \leq 0.05$
- **PRINS G.S. (1998)** ., In : **Knobil E., Neill J.D. (eds.) Encyclopedia of reproduction. Volume 4.** Academic press, San Diego, 360-367p.
- **Root, ROOT, M.V. (2007)** ., The value of canine semen evaluation for practitioners.
- **ROTA A., STROM B. et LINDE-FORSBERG C. (1995)** ., Effects of seminal plasma and three extenders on canine semen stored at 4°C. *Theriogenology*, 44, 885-900p.
- **SETCHELL B. (1991)** ., Male reproductive organs and semen. In : CUPPS P., editor. *Reproduction in domestic animals.* 4th ed. San Diego : Academic press, 221-245p.
- **SIRIVAIYAPONG S., URSEM P., BEVERS M. et COLENBRANDER B. (2001)** ., Effect of prostatic fluid on motility, viability and acrosome integrity of chilled and frozen-thawed dog spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility* , 57 (suppl), 383-386p.
Theriogenology, 68, 329-337p.

- **TONER J P., MOSSAD H., GROW D R et al. (1995) .**, Value of sperm morphology assessed by strict criteria for production of the outcome of artificial [intrauterine] insemination. *Andrologia*, , 27 .143-148p.
- **TSUTSUI T., TEZUKA T., MIKASA Y., SUGISAWA H., KIRIHARA N., HORI T. et KAWAKAMI E. (2003) .**, Artificial insemination with canine semen stored at low temperature. *Journal of Veterinary Medicine Science*, 65, 307-312p.
- **VAISSAIRE JP. (1977) .**, *Sexualité et Reproduction des Mammifères Domestiques et de laboratoire*. Paris : Maloine, 457 p.

Les annexes

Tableau : Caractéristique des éjaculats utilisés pour l'expérience

Chiens	Volume (ml)	Mobilité individuelle	Mobilité massale	Vitalité	Moy/Concentration (Spz/ml) 10^6
ENZO	2	4/5	70%	83%	642,5
WILIS	2	3/5	70%	70%	727
ROKI	1.5	4/5	80%	90%	597,5
BOB	1.5	5/5	80%	77%	980

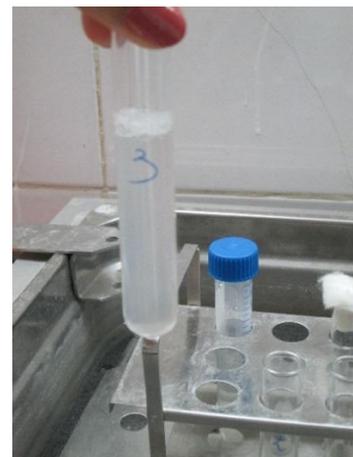
Les trois différentes fractions spermatiques recueillies chez le chien



Ph :Pré spermatique
(Photos personnel).



Ph .Spermatique



Ph .épidydimaire

Les étapes de coloration



Table Matière

INTRODUCTION	1
<i>Chapitre I : Partie bibliographique</i>	
1.1. Anatomie et rôles des différentes parties du tractus génital male du chien	3
1.1.1 Les testicules.....	3
1.1.2. Les épидидymes.....	5
1.1.3. Les canaux déférents	6
1.1.4. La prostate.....	6
1.1.5. L'urètre.....	6
1.1.6. Les glandes de Littre.....	6
1.1.7. Le pénis.....	6
2. la semence canine	8
2.1. Sperme canin.....	8
2.2. Caractéristique de la semence.....	8
2.3. Composition de la semence canine.....	9
2.3.1. Spermatozoïde.....	9
2.3.1.1. Définition.....	9
2.3.1.2 Description du spermatozoïde.....	9
2.3.2. Le liquide séminal	10
3. Evaluation de la semence canine.....	10
3.1. Le spermogramme.....	10
3.1.1. Volume.....	10
3.1.2. Aspect.....	10
3.1.3. Ph.....	10
3.1.4. Motilité.....	10
3.1.4.1 Motilité massale.....	10
3.1.4.2. Motilité individuelle.....	11
3.1.5. Numération.....	11
3.1.6. Morphologie des spermatozoïdes.....	12
4. Le spermocytogramme.....	16
4.1. Définition.....	16
4.2. Techniques du spermocytogramme.....	16
4.2.1. Préparation des frottis.....	16

4.2 .2 La technique de coloration.....	16
4.2.3- Technique de lecture.....	17
4.3. Méthodes de classifications.....	17
4.3.1- Méthode de TYGERBERG et de KRUGER.....	17
4. 3.2. Classification de DAVID.....	17
5. Récolte de la semence de chien.....	24
5.1. Récolte manuelle.....	24
5.1 .1. Environnement.....	24
5.1.2. Matériel.....	24
5.1.3. Technique.....	26
6. Evaluation de la vitalité	27
7. L'analyse informatique de la semence (CASA : computerzed Assisted Sperm Analysis) :L'analyseur informatique de la semence ou communément appelé le système CASA	27

Chapitre II : Matériel et Méthodes

1. objectifs	29
1.1. Matériel	29
1.2.1. Animaux.....	30
2. Méthodes	31
2.1. Récolte de la semence.....	31
2.2. Les étapes de récolte.....	32
2.3. Examen de la semence.....	33
2.4. Spermogramme.....	33
2.5. Dilueur.....	33
3. Technique de coloration.....	34
3.1. Technique de Diff-quick®.....	34
3.2. Technique Spermlue®.....	34
4. Analyse statistique.....	35

Chapitre III : Résultats et Discussion

3.1. Résultat	36
----------------------------	-----------

3.1.1. Evaluation des spermatozoïdes de la semence canin.....	36
3.2. Discussion	49
<i>Conclusion générale</i>	
Conclusion	52
Références bibliographique.....	53
Annexes	