République Algérienne démocratique et populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur
et de la Recherche Scientifique
École Nationale Supérieure Vétérinaire

ENSV
ECOLE NATIONALE SUPERIEURE VETERINAIRE
ALGER

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
المدرسة الوطنية العليا للبيطرة

ÉCOLE NATIONALE SUPÉRIEURE VÉTÉRINAIRE

Projet de fin d'études

En vue de l'obtention du
Diplôme de Docteur Vétérinaire

Estimation de la concentration du sperme épididymaire équin des étalons d'âge différents au niveau de l'abattoir d'EL-HARRACH

Présenté par : - **BADIS amina**

- KENOUNI Aida

- BENRITAB Aicha

Soutenu le : 03 /07/2018

Devant le jury composé de:

- **Présidente : Mme SAADI H.** Maitre de conférences A à l'ENSV.
- **Promotrice : Mm AOUANE N.** Maitre-assistant classe A à l'ENSV.
- **Examinateur 1: Mr. BOUDJELLABA S.** Maitre-assistant classe A à l'ENSV
- **Examinatrice 2 : Mme BOULBINA I.** Maitre-assistant classe A à l'ENSV.

Année universitaire : 2017/2018

Remerciement

Nous souhaitons manifester nos sincères remerciements à :

DIEU le tout puissant qui nous a donné la force et la patience, ainsi que le courage pour aller jusqu'au bout de ce travail.

On exprime notre profond remerciement et notre vive reconnaissance à **Mme. AOUANE Nedjma**, qui avait accepté d'encadrer et de diriger ce travail avec rigueur scientifique et pragmatisme. Nous avons été fascinés par votre abord facile et votre simplicité, vos qualités scientifiques et humaines. Ainsi de ceux de **Mr. BOUDJELLABA Sofiane** qui nous a profondément aidé et encouragé.

Nous remercions aussi l'honorable jury qui a consenti à juger ce travail :

- **Mme SAADI H.** Maitre de conférences A à l'ENSV ; nous vous remercions de vos qualités humaines et de femmes de science, soyez rassuré de notre sincère reconnaissance.
- **Mr. BOUDJELLABA S.** Maitre-assistant classe A à l'ENSV. Nous vous remercions de votre aide dont nous vous avez fourni pendant la recherche pour aboutir à rédiger ce mémoire trouvez ici notre sincère reconnaissance.
- **Mme BOULBINA** Maitre-assistant classe A à l'ENSV. Nous vous remercions de nous avoir aidé et juger ce modeste travail ; vos qualités humaines nous ont beaucoup marqué

A l'ensemble de la famille enseignante à l'ENSV ; nous vous remercions de votre rigueur d'homme de science et vos qualité humaines qui nous ont beaucoup marqué.

Nous tenons aussi à remercier l'employé de la bibliothèque, surtout **Mr. YACINE**. Et exprimer notre vive reconnaissance à **Mr. DJAMEL** un employé à l'abattoir d'EL-HARRACH, qui nous a aidé énormément à réaliser ce modeste travail.

Nos sentiments de reconnaissances et nos remerciements vont également à l'encontre de toute personne qui a participé de près ou de loin, directement ou indirectement à la réalisation de ce travail.

Sans oublier bien sur l'aide précieuse, la gentillesse et la compréhension de nos familles qui grâce à leur soutien moral et financier, ce travail a vu le jour.

Dédicace

Je dédie ce modeste travail

A mes très chers parents à qui je dois toutes mes études, que dieu me les gardes.

A mon grand-père ABDESSELEM que mon dieu l'accueillit dans son vaste paradis, et à ma grande mère à qui je souhaite une longue vie.

A mes frères et mes sœurs.

A tous mes proches, oncles et tantes et leurs familles

A mes collègues de travail : AIDA et AICHA

A mes amis, je cite en particulier MARWA

Ainsi à toute la promotion 2013 de l'ENSV

BADIS Amina

Dédicaces

***Mes chères parents**, merci pour ce que vous m'avez inculqué, les sacrifices que vous avez consentis pour moi resteront à jamais gravés dans ma mémoire. Aucune dédicace ne pourrait exprimer mon respect, ma considération et mes profond sentiment envers vous, je prie le bon dieu de vous bénir, de veiller sur vous. J'espère que vous serez toujours fières de moi.*

*Mon chère frère **«abdesselem»**, mes chères sœurs « **yasmine, dounia, lina, assma»** les mots ne suffisent pas pour exprimer l'attachement, l'amour et l'affection que je porte envers vous, vous êtes présents à tous mes moment, je vous souhaite un avenir plein de joie, de bonheur, de santé et de réussit, je vous exprime à travers ce travail mes sentiments de fraternité et d'amour.*

*Je remercie mes collègues **«aida KENOUNI et amina BADIS»**, mes chers amis et frères **«waffa , rania , marwa, soufiane, hamza, ilyes, wiam, khawla, walid , mohamed, baba moussa, mohamed, nouha, amel , cherif , khadidja, nawel, amra, abira, nadjib et hichem»**, je ne peux trouver les mots justes et sincères pour vous exprimer mes affections et mes pensées, vous êtes pour moi des frères, sœurs et des amis sur qui je peux compter. En témoignage de l'amitié qui nous uni et des souvenirs de tous moments que nous avons passé ensemble, je vous dédie ce travail et je vous souhaite une vie pleine de santé et de bonheur.*

*A tous les membres de ma famille, **«BENRITAB»**, petite et grande veuillez trouver dans ce modeste travail l'expression de mon affection et tous mes vœux de bonheur.*

A tous mes professeurs : Leur générosité et leur soutien m'oblige de leurs témoigner mon profond respect et ma loyale considération.

BENRITAB Aicha

- **Table des matières :**

Introduction **1**

Chapitre I : Rappels d'anatomie et de physiologie sexuelle de l'étalon 2

I -Anatomie de l'appareil reproducteur de l'étalon : 2

I.1. Enveloppes des testicules : 2

I.1.1. Les enveloppe!s testiculaires superficielles : 2

1- Scrotum : 2

2 –Fascia spermatique externe : 2

I.I.2. Les enveloppes testiculaires profondes : 2

1 -Crémaster : 2

Fascia spermatiques interne et tunique vaginale: 2

I.2.Testicule : 3

I.3. Voies spermatiques : 3

1. L'épididyme : 3

2. Conduit ou canal déférent : 5

3. Conduit ou canal éjaculateur : 5

4. Urètre : 5

I.4. Glandes annexes de l'urètre : 5

I.4.1. Glande vésiculaire : 5

I.4.2. La prostate : 5

I.4.3. Glande bulbo-urétrale : 5

I.5. La partie libre du pénis : 5

II.1. La saison sexuelle de l'étalon : 7

II.2. Spermatogénèse et spermiogénèse : 7

II.2.1. Spermatogénèse : 7

II.2.2. La spermiogénèse : 8

II.3. Le spermatozoïde : 8

Chapitre II : Les techniques habituelles de récolte du sperme 10

I.1. récolte de sperme d'étalon 10

I.1.1.L'éjaculation: 10

I.1.2. Le vagin artificiel : 10

I.1.3. L'électro-éjaculateur : 10

I.2. Techniques de récolte du sperme épididymaire : 11

I.2.1. Aspiration percutanée : 11

I.2.2. Le cathétérisme urétral : 11

I.2.3. Méthode de flottaison : 12

I.2.4. Technique du 'flush rétrograde' (voir la partie expérimentale). 12

Chapitre III : Les techniques d'analyse du sperme épididymaire 13

Rappels sur le spermogramme et le spermocytogramme : 13

I.1. Indications d'un spermogramme : 13

I.2. Paramètres du spermogramme : 13

a. Macroscopique : 13

b. Microscopique : 15

c. Nouveaux contrôles de qualité : 17

II. L'étude de la concentration du sperme épididymaire : 18

II.1. La cytométrie de flux : 18

II.2. les cellules hématimètrique : 18

II.3. La coloration nucléaire : 20

II.4. le spectrophotomètre : 21

1. Définition d'un spectrophotomètre 21

2. Absorbance d'une substance : 21

3. Loi d'absorption moléculaire : loi de BEER-LAMBERT 21

4. Principe de fonctionnement du spectrophotomètre 22

5. L'étalonnage du spectrophotomètre : 23

I. Matériels et méthodes : 24

I.1. Echantillons : 24

I.2. Matériels : 24

II. Méthodes : 25

II.1. De dissection....25

- Technique de flush rétrograde : 25

II.2. De dilution : 27

II.3. De lecture :....28

II.3.1. Par cellule de malassez 28

II.3.2. Par spectrophotomètre : 29

I. Résultats : 32

II. Discussion : 35

Conclusion ……...……..37

Annexes

References

Liste des tableaux :

Tableau 1 : matériel utilisé au laboratoire.

Tableau 2 : Résultats du test de Fisher.

Tableau 3: Les échantillons étudiés.

Tableau 4 : Echantillons utilisés pour la formule correspondante à la dilution 1/1000.

Tableau 5: Echantillons utilisés pour la formule correspondante à la dilution 1/1200.

Tableau 6: Avant et après correction de la dilution 1/1000.

Tableau 7 : Avant et après correction de la dilution 1/120

Table des figures :

Figure 1 : Enveloppes des testicules (coupe transversale) 3
Figure 2 : Structures du testicule et de l'épididyme gauche 4
Figure 3 : Coupe longitudinale de la partie libre du pénis 6
Figure 4 : La spermatogenès 7
Figure 5 : structure du spermatozoïd 9
Figure 6 : Carré d'une cellule de thomas 18
Figure 7 : Echantillons à l'abattoir d'EL-HARRACH –Alger- 24
Figure 8 : Etapes suivies pour la dissection des testicules 26
Figure 9 : Les composants de Na Cl formol 27
Figure 10 : technique de dilutio 27
Figure 11: réctangle d'une cellule de malssez 28
Figure 12: mode de comptabilité de la longueur d'onde 30
Figure 13 : courbe de dilution 1/1000 avant correction 30
Figure 14: courbe de dilution 1/1200 avant correction 31
Figure 15: courbe de dilution 1/1000 et 1/1200 après correction 32

Partie bibliographique

Introduction

Introduction :

La reproduction équine est un domaine en pleine évolution avec l'augmentation du nombre d'inséminations artificielles, notamment l'insémination artificielle profonde et le développement du transfert d'embryon. Quel que soit la méthode utilisée, l'objectif principal est d'obtenir une bonne fertilité en fin de saison. Pour se faire il est important de se soucier aussi bien de la jument que de l'étalon lors de l'analyse des résultats de fertilité. De ce fait nous aborderons ici le thème de la fertilité de l'étalon, et plus précisément

La méthode de calcul de la concentration du sperme épididymaire, la raison pour laquelle on s'est intéressé a cette partie du tractus génital est qu'elle s'est révélée extrêmement utile surtout quand un étalon de valeur meurt subitement et qu'aucun prélèvement de son patrimoine génétique n'a été effectué auparavant.

L'hématimètrie représente la technique de référence pour mesurer la concentration du sperme épididymaire, mais elle présente quelques désavantages ; méthode très lente et quand le nombre d'échantillons est élevé, le facteur humain entre en jeu et impacte la certitude des résultats, c'est pour ça qu'une alternative a été proposée qui est le spectrophotomètre.

Quant à la technique d'analyse qui est le spectrophotomètre, Apres étalonnage de l'appareil à une longueur d'onde spécifique correspondante, et après élaboration d'une formule linéaire qui relie la concentration **Y** avec la densité optique **X**, on peut facilement déduire la concentration, en évitant les contraintes de comptage individuel des spermatozoïdes et après avoir obtenu des résultats corrélés avec ceux de l'hématimètrie, on a trouvé qu'elle est beaucoup plus rapide, facile et performante.

Notre présente étude bibliographique se compose de trois parties. Les deux premières parties, abordent des rappels anatomo-physiologiques ainsi que les différentes méthodes de récolte du sperme, soit éjaculé ou épididymaire.

La troisième partie décrit les techniques d'analyses et de calcule de concentration de routine.

Se rajoute à ça, une étude expérimentale qui a permis l'estimation de la concentration du sperme épididymaire de 72 échantillons prélevés sur des chevaux Barbes à l'abattoir d'EL HARRACH (ALGER).

Chapitre I

Rappels d'anatomie et de physiologie sexuelle de l'étalon

Chapitre I : Rappels d'anatomie et de physiologie sexuelle de l'étalon

I -Anatomie de l'appareil reproducteur de l'étalon :

L'appareil génital mâle est formé par l'ensemble des organes qui élaborent le sperme et permettent son dépôt dans les voies génitales femelles. Le sperme opaque et blanc grisâtre chez l'étalon, contient les gamètes mâles ou spermatozoïdes en suspension dans un milieu ; le plasma séminal qui assure leur survie **(COLLIN, 2003)**

I.1. Enveloppes des testicules :

Ces enveloppes protègent et soutiennent la glande génitale et ses premières voies d'excrétion.

I.1.1. Les enveloppes testiculaires superficielles (figure01):

1- Scrotum :

Il est constitué de :

- **La peau :** elle forme un sac superficiel commun aux deux testicules.
- **Dartos :** il double intimement la face profonde du scrotum.

2 –Fascia spermatique externe :

Le fascia spermatique externe est une couche de tissu conjonctif formée de minces lamelles superposées et translucides.

I.I.2. Les enveloppes testiculaires profondes (figure 01) :

1 -Crémaster :

Le muscle crémaster est un muscle large, il est formé de fibres musculaires striées, sa contraction est volontaire et rapide **(COLLIN, 2003)**

Fascia spermatiques interne et tunique vaginale:

Ils forment La gaine vaginale du testicule est en - réalité une fibro-séreuse **(COLLIN, 2003) (Figure 1)**

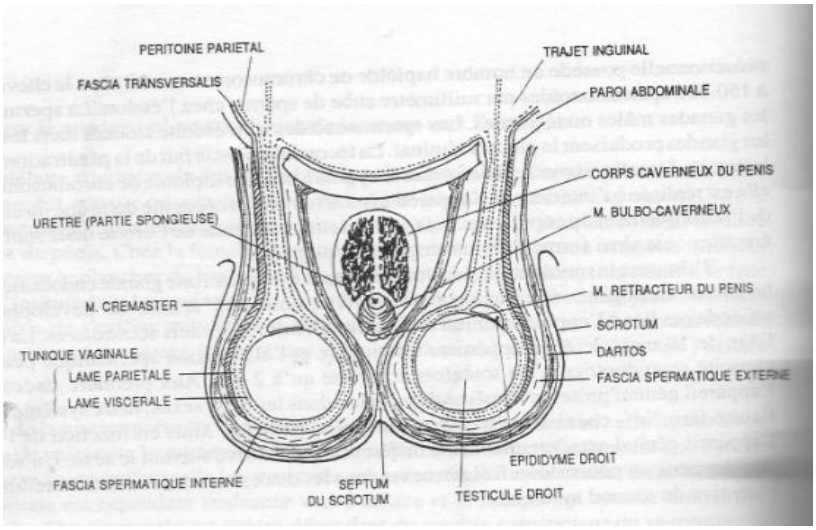


Figure 1 : Enveloppes des testicules (coupe transversale) (COLLIN, 2003)

I.2.Testicule :

Le testicule, glande génitale mâle, est un organe pair. Il a une fonction exocrine en assurant la spermatogénèse et une fonction endocrine en sécrétant la testostérone. **(COLLIN, 2003)**

I.3. Voies spermatiques :

Les voies spermatiques sont les voies d'excrétion du sperme : elles vont des testicules à l'urètre. **(COLLIN, 2003)**

1. L'épididyme :

L'épididyme représente la première partie des voies spermatiques. Il est situé le long du bord dorsal ou épididymaire du testicule.

- **Conformation** : l'épididyme est fondamentalement un système de conduits dont la longueur totale peut atteindre 1000 fois la longueur du testicule. L'organe est cependant pelotonné, replié sur lui-même, entouré par une membrane ce qui lui donne l'aspect d'une production allongée ne mesurant finalement que 12 à 13 cm de longueur ; on lui reconnait une tête, un corps et une queue.

La tête de l'épididyme : élargi couvre le pole crânial du testicule avec lequel elle est en continuité directe puisqu'à ce niveau, elle reçoit les 12 à 13 canalicules efférents provenant eux-mêmes du reste- testis.

Le corps de l'épididyme : est aplati d'un coté à l'autre. Il est parallèle au bord dorsale et épididymaire du testicule.

La queue de l'épididyme : est globuleuse et située médialement par rapport au pôle caudal du testicule avec lequel elle n'est pas en continuité de substance. Elle est de plus attachée au fascia spermatique interne. La queue de l'épididyme se prolonge vers le haut par le canal déférent.

- **Structure :** l'épididyme est constitué par un très long système canaliculaire enfermé dans une membrane albuginée et recouvert par une séreuse.

- Le système canaliculaire de l'épididyme est formé au niveau de la tête par l'aboutissement des canalicules efférents, prolongation du rete testis. Ils confluent pour former un conduit unique très flexueux, le conduit épididymaire dont la longueur peut atteindre 85 cm chez le cheval.
- La progression des spermatozoïdes dans le système canaliculaire est assurée par les fibres musculaires lisses présentes au niveau de l'albuginé de la tête de l'épididyme, et aux battements des cils de l'épithélium des canalicules efférents et la musculature lisse du conduit épididymaire qui est responsable d'ondes péristaltiques régulières. Durant cette traversée, les spermatozoïdes murissent et deviennent fécondants. **(COLLIN, 2003)** (Figure 2)

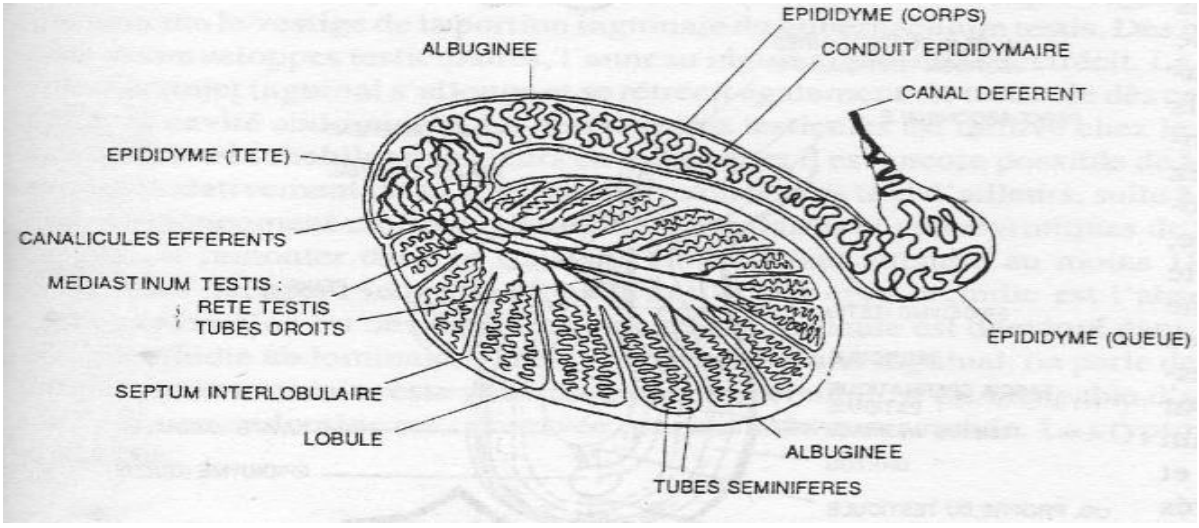


Figure 2 *:* Structures du testicule et de l'épididyme gauche (COLLIN, 2003)

2. Conduit ou canal déférent :

Le conduit ou canal déférent est la partie des voies spermatiques qui va de la queue de l'épididyme à l'origine de l'urètre. **(COLLIN, 2003)**

3. Conduit ou canal éjaculateur :

Le conduit éjaculateur résulte de la réunion de la terminaison du conduit déférent avec celui de la glande vésiculaire. Il est très bref chez le cheval. **(COLLIN, 2003)**

4. Urètre :

Est un conduit impair, qui sert chez le mâle à la fois à l'excrétion de l'urine pendant la miction, et du sperme pendant l'éjaculation. **(COLLIN, 2003)**

I.4. Glandes annexes de l'urètre :

Au nombre de trois glandes, la prostate et les deux glandes bulbo-urétrales déversent au moment de l'éjaculation leur sécrétion dans la cavité de la partie pelvienne de l'urètre.

I.4.1. Glande vésiculaire :

La glande vésiculaire ou glande séminale est une glande allongée, paire située au-dessus de la vessie et de son col ; elle déverse son produit de sécrétion dans l'urètre par l'intermédiaire d'un conduit ou canal éjaculateur rudimentaire qu'elle a en commun avec le conduit ou canal déférent. **(TEMIM, 2015)**

I.4.2. La prostate :

La prostate est plus un complexe glandulaire qu'une véritable glande impaire, la prostate de l'étalon est une glande large, bilobée qui coiffe la face dorsale et les faces latérales de l'urètre et les côtés du col de la vessie. **(TEMIM, 2015)**

I.4.3. Glande bulbo-urétrale :

De chaque côté de la face dorsale de la partie pelvienne de l'urètre. Un peu avant du bulbe de l'urètre, existe une glande bulbo-urétrale ou glande de Cowper **(TEMIM, 2015)**

I.5. La partie libre du pénis :

La zone du périnée s'étend de l'anus aux enveloppes testiculaires. Le prépuce y fait suite et se termine par un ostium préputial. Le prépuce est un repli de peau en continuité avec la peau de l'abdomen qui entoure la partie libre du pénis **(BARONE, 2001) (Figure 3)**

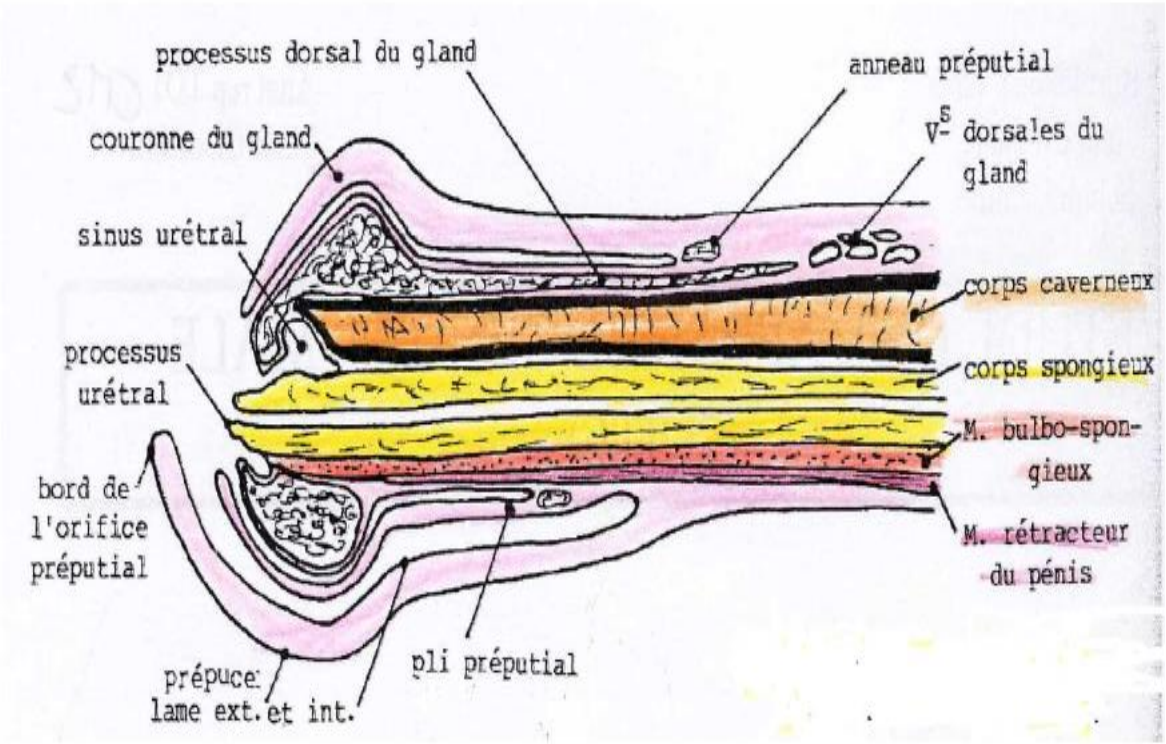


Figure 3 : Coupe longitudinale de la partie libre du pénis (BARONE, 2001)

II : Physiologie sexuelle de l'étalon

II.1. La saison sexuelle de l'étalon :

L'étalon peut se reproduire physiologiquement toute l'année mais de part la saisonnalité de la jument, il exprime son comportement sexuel en même temps que cette dernière. Il est par contre possible de prélever des étalons toute l'année soit pour effectuer une analyse de la semence lors de problème de fertilité, soit pour congeler des paillettes de sperme **(TIBARY et al., 2005)**

II.2. Spermatogénèse et spermiogénèse :

La formation du spermatozoïde se fait en deux étapes : la spermatogénèse et la spermiogénèse, qui débutent au niveau des tubes séminifères puis se déroulent dans l'épididyme, pour finir dans les voies génitales femelles. La durée de la formation du spermatozoïde est de **49 jours** chez l'étalon. La connaissance de cette durée est importante pour la préparation de l'animal en vue d'une saison de monte. De même un incident influençant la production des spermatozoïdes peut avoir des répercussions sur l'aptitude reproductrice 49 jours plus tard. **(HEYMON et al., 2005)**

II.2.1. Spermatogénèse :

La spermatogénèse commence dans les testicules, en tout premier lieu dans les tubes séminifères. Elle se met en route après la puberté sous l'action de la LH (luteinising hormone) sur les cellules de leydig et de la FSH (follicule stimulating hormone) sur les cellules de Sertoli **(HEYMON et al., 2005)**

Chez l'étalon, la spermatogénèse permet de produire **16 x 10^6** spermatozoïdes par jour Par gramme de testicule **(HEYMON et al., 2005) (Figure 4)**

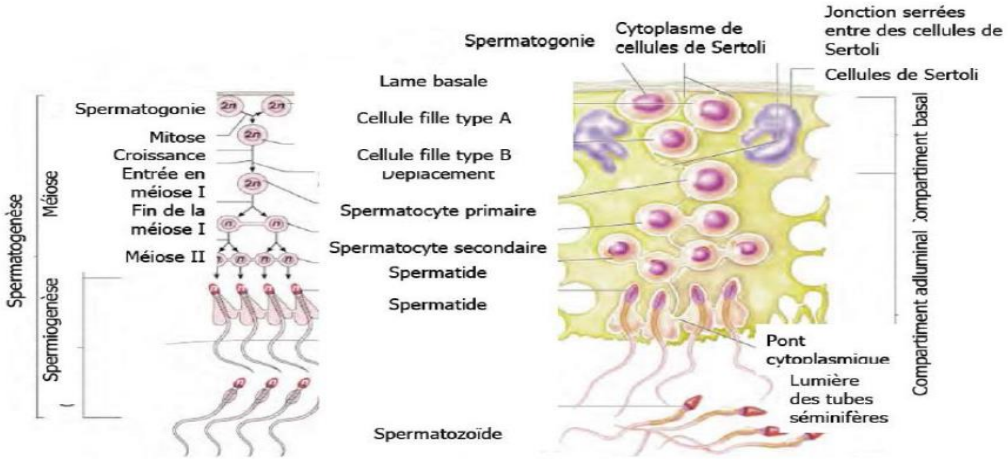


Figure 4 : La spermatogenèse (SENGER ,2012)

II.2.2. La spermiogénèse :

La spermiogénèse permet le passage de la spermatide (cellule arrondie ayant une organisation cytoplasmique banale) au spermatozoïde (petite cellule très effilée, mobile, pauvre en cytoplasme et en réserves **(THIBAULT et al., 2001).**

Cette étape correspend à de nombreux remaniements cytoplasmiques et à la condensation de la chromatine (DADOUNE et al., 2001)

II.3. Le spermatozoïde :

Le spermatozoïde correspond au gamète mâle, il transporte l'information génétique dans le tractus génital femelle et la délivre à l'intérieur de l'ovocyte. Afin d'accomplir cette mission, le spermatozoïde est hautement différencié. Il s'agit d'une cellule de petite taille mais longuement flagellée et mobile. **(PONTHIER et al., 2014)**

La taille et la forme du spermatozoïde varient entre espèces **(SENGER, 2005).** Chez l'étalon, il mesure 60 µm de long sur 2,7 µm de large **(AMANN et al., 2011**). Morphologiquement, le spermatozoïde des mammifères est divisé en deux parties **(figure 5)** :

La tête : comprend l'acrosome, le chapeau nucléaire et le noyau cellulaire

La queue ou flagelle : comprend la pièce intermédiaire, la pièce principale et la pièce terminale.

La membrane cytoplasmique constitue la barrière avec le milieu extérieur. Elle n'est pas homogène mais est divisée en de nombreux micro-domaines (mosaïque) où des protéines spécifiques sont fixées **(SENGER, 2005 ; LOPEZ et al., 2007 ; BOERKEET *et al.*, 2008 ; GADELLA, 2008)**

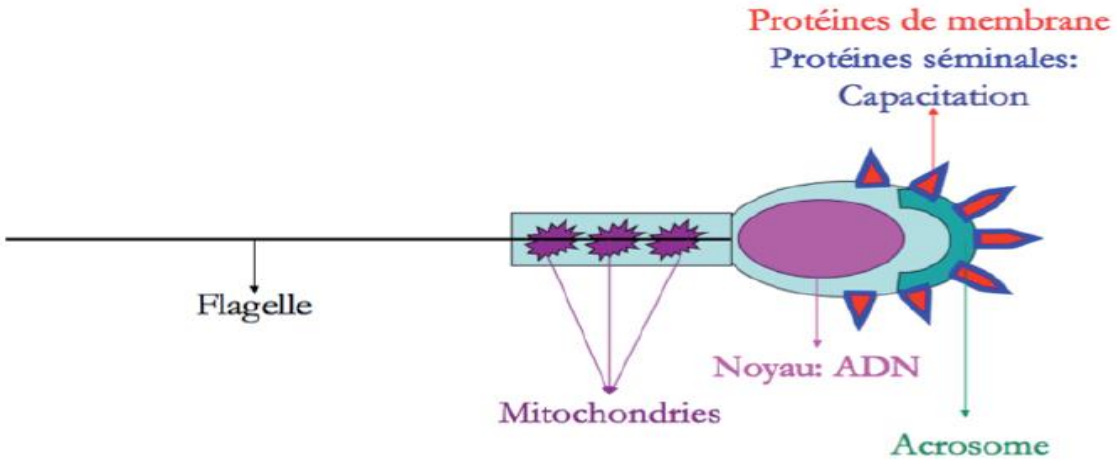


Figure 5 : structure du spermatozoïde (PONTHIER et al., 2014)

Chapitre II

Les techniques habituelles de récolte du sperme

Chapitre II : Les techniques habituelles de récolte du sperme

I.1. récolte de sperme d'étalon

Le prélèvement de sperme est une phase essentielle lors de l'analyse de la semence. Il devra être fait dans les meilleures conditions de sécurité et d'efficacité avec comme objectif principal de ne pas détériorer la qualité de la semence **(BLANCHARD *et al.*, 2003)**

I.1.1.L'éjaculation:

l'étalon est sensible à des stimulations visuelles, olfactives (odeur de l'urine de la jument en chaleur) et tactile entrainant le flehmen ou rictus sardonique : la lèvre supérieure est retroussée et la tète levée **(CHEVALIER, 1980).**

Il est possible de distinguer :

-le pré-sperme : une sécrétion visqueuse qui coule pendant l'excitation sexuelle, avant le vrai sperme.
-la fraction riche des premiers jets, un mucus blanchâtre ou incolore, de 30 à 75 ml.
-le post-sperme : un gel trouble et visqueux de 8 à 85 ml (rôle antimicrobien).
-la fraction post-coïtale : incolore, peu visqueuse et avec peu de gel **(NICOLICH, 1989)**

I.1.2. Le vagin artificiel :

Il existe une grande variété de vagins artificiels en provenance des nombreux pays qui pratiquent l'insémination artificielle. Ceci à l'avantage de permettre de répondre à toutes les situations qui peuvent se présenter.

Le principe est d'utiliser en réservoir d'eau chaude pour reproduire la pression et la température existant à l'intérieur du vagin de la jument. Globalement, il existe plusieurs types de vagins artificiels **:(Les haras nationaux, 2014)**

- Vagin artificielle de type <<Colorado >>
- Vagin artificiel type Missouri
- Vagin artificielle type Japonais
- Vagin artificiel de type <<polonais>>

I.1.3. L'électro-éjaculateur :

L'éléctro-éjaculation consiste à provoquer l'émission de sperme par l'excitation électrique des nerfs érecteurs et éjaculateurs. Elle est réalisée sur animal debout ou couché.

L'appareillage comporte une sonde rectale de forme ogivale munie d'électrodes bipolaires parcourues d'un courant d'intensité moyenne mais de bas voltage et une tension constante. (**NOAKES et al., 2009).**

Le caractère agressif de l'animal justifie l'utilisation d'une anesthésie générale pour cette technique et ce n'est pas le seul inconvénient, en effet, la retro éjaculation (le sperme fait fausse route et se retrouve dans la vessie) va altérer la fertilité plutard du fait du caractère spermicide de l'urine et donc, y aura diminution de la viabilité de spermatozoïdes et la partie non contaminée sera insuffisante comme dose de semence.

Remarque : dans cette étude, la rétrogradation de l'éjaculation est expliquée par l'électroéjaculation, dans une autre concernant le chien, c'est l'administration de la Xylazine qui en est responsable**.**

I.2. Techniques de récolte du sperme épididymaire :

Il arrive qu'un cheval soit atteint d'affections qui le rendent inapte à la saillie artificielle (fracture, coliques..), d'autres alternatives sont alors proposées :

I.2.1. Aspiration percutanée :

elle se fait sur un animal debout après injection d'un anesthésique local en intra testiculaire (lidocaïne), cette dernière a révélé un effet spermicide**.**

(FALOMO et al, 2016)

I.2.2. Le cathétérisme urétral :

Le cathétérisme urétral après injection de médétomidine est une technique décrite chez le chat et l'étalon. Nous manquons encore de recul sur cette nouvelle technique car très peu d'auteurs la décrivent, mais elle semble prometteuse. L'utilisation d'agents α2-agonistes provoque, chez l'étalon, l'éjaculation d'un sperme de bonne qualité, sans nécessité d'accouplement et ne nécessite pas d'anesthésie générale, contrairement à l'électroéjaculation. **(ZAMBELLI et al, 2008)**

Ces méthodes ci-dessus se font sur un cheval vivant, dans d'autres circonstances ou un animal de valeur est castré sans conservation préalable de sa semence, ou dans le cas d'animaux en voie d'extinction ou encore, une mort subite de l'animal, certaines techniques se révèlent d'une haute importance. On peut réaliser le prélèvement jusqu'à douze heures post-mortem sur des animaux conservés au froid (environ 4 à 6 °C).

Il y a également une démarche croissante des propriétaires et des éleveurs qui souhaitent conserver le sperme de leur animal post-castration ou post-mortem pour réaliser de nouvelles descendances **(BREUMMER, 2006)**. On cite :

I.2.3. Méthode de flottaison :

l'épididyme est soumis à de petites incisions horizontales (de 10 à 15 et espacées de 2mm) dans sa partie distale à l'aide d'un scalpel puis il est mis dans un tube coné de 50ml et recouvert de 5ml de lait commercial, l'échantillon est ensuite agité et laissé à température ambiante pendant 10min, la solution est ensuite centrifugée pour récupérer le culot qui contient les spermatozoïdes. Cette méthode donne de bons résultats malgré le risque qui y a avec la contamination par le sang à cause des incisions.(**BRUEMMER, 2006**)

I.2.4. Technique du 'flush rétrograde' (voir la partie expérimentale).

Chapitre III

Les techniques d’analyse du sperme épididymaire

Chapitre III : Les techniques d'analyse du sperme épididymaire

Rappels sur le spermogramme et le spermocytogramme :

Le spermogramme permet d'évaluer les qualités de reproducteur d'un étalon à l'aide d'un examen de sa semence, pour une interprétation correcte, la procédure doit être standardisée, avec vidange des réserves séminales. Le spermocytogramme quant à lui, évalue la morphologie et toutes les anomalies qui en découlent : déformation de la tête, de la pièce intermédiaire et du flagelle.

I.1. Indications d'un spermogramme :

Il est important de faire périodiquement un spermogramme complet, notamment pour les raisons suivantes :(**CAILLAUD et al., 2014)**

- achat,
- examen de routine avant chaque saison de monte,
- mise à l'IA,
- avant congélation,
- doute sur la fertilité d'un étalon (faibles résultats sur les juments, atteinte d'un testicule, infection du harem),
- estimation du nombre de juments pouvant être servies,
- en cas de comportement sexuel anormal,
- suivre la convalescence d'une affection,
- l'interprétation du spermogramme pourra diverger suivant le motif de sa réalisation.

I.2. Paramètres du spermogramme :

a. Macroscopique :

- **volume :**

L'éjaculat de l'étalon est composé de deux fractions majeures :

Une fraction liquide (contenant la majorité des spermatozoïdes) et une fraction gélatineuse. Si le tube collecteur dispose d'un filtre, le volume de la fraction liquide peut être lu directement sur ce tube collecteur. Par contre, le volume de la fraction gélatineuse doit être établi à partir de la

portion retenue par le filtre. Certains étalons ont des éjaculats complètement dépourvus de gel. **(TIBARY et al., 2005 ; HEYMON et al., 2005 ; BLANCHARD et al., 2003).**

Le volume est plus faible pour les étalons de sang (30-50 ml) que pour les races lourdes (120-150 ml) **.**

- **couleur et consistance :**

La couleur normale de l'éjaculat équin est grisâtre à blanchâtre selon la concentration en spermatozoïdes. Cette couleur peut devenir rose, rougeâtre ou rouge vif lorsque le sperme contient du sang (hémospermie). Une couleur jaunâtre peut signaler la présence d'urine (urospermie) ou de pus (pyospermie). L'éjaculat est homogène et de consistance aqueuse sauf lorsqu'il contient une partie de la fraction gélatineuse, Il peut paraitre trouble. **(TIBARY et al., 2005 ; HEYMON et al., 2005 ; BLANCHARD et al., 2003).**

- **le pH :**

Le pH de la fraction sans gel du sperme peut être mesuré rapidement à l'aide d'un Papier pH, mais il est préférable d'utiliser un pH-mètre précis. Le pH doit être mesuré dès que possible après la récolte pour éviter le biais dû aux produits issus du métabolisme des spermatozoïdes. Le pH normal du sperme d'étalon varie entre 7,2 et 7,7. Il subit des variations physiologiques selon la saison, la fréquence des éjaculations et la concentration.

Un pH supérieur à 7,7 indique souvent une infection ou une inflammation de l'appareil génital interne, une contamination par de l'urine ou un autre produit alcalin tel que le savon ou une éjaculation incomplète.

Le pH peut également être affecté par la méthode de récolte et par le type de lubrifiant éventuellement utilisé. Les changements de pH et d'osmolarité provoqués par l'urospermie ont un effet négatif sur la mobilité des spermatozoïdes. **(TIBARY et al., 2005 ; HEYMON et al., 2005 ; BLANCHARD et al., 2003).**

b. Microscopique :

- **La mobilité :**

Les mouvements des spermatozoïdes peuvent être évalués au microscope entre lame et lamelle sur une platine de microscope chauffante. On distingue la mobilité massale et la mobilité individuelle, cette dernière est divisée en mobilité totale et progressive.

La mobilité totale correspond au pourcentage de spermatozoïdes qui se déplacent quelle que soit

leur trajectoire. La mobilité progressive reflète, quant à elle, la proportion de spermatozoïdes se déplaçant en ligne droite (H**OOGEWIJS et al., 2011)**
La vitesse des spermatozoïdes: une note est attribuée (0=immobiles à 4=rapides) **(TIBARY et al., 2005 ; BLANCHARD et al., 2003).**

- **le % de spermatozoïdes vivants :**

''Viabilité du sperme'' est un terme inadéquat car le vrai examen dépend de la membrane si elle est intacte ou pas et pareil pour ''spermatozoïde vivant ou mort'' car un spermatozoïde immobile est considéré comme mort alors qu'il est capable de fertiliser par injection intra cytoplasmique. **(NISHIKAWA, 1959)**

L'éosine est un colorant entrant dans les spermatozoïdes lorsque leur membrane est lésée **(LEEB et al., 1954 ; BJORNDAHL et al., 2003)**. La coloration à l'éosine-nigrosine permet donc de colorer et de quantifier la proportion de spermatozoïdes dont l'intégrité membranaire est perdue.

De nouvelles méthodes observant la fluorescence du noyau après coloration a l'iodure de propidium permettent de déterminer le pourcentage de spermatozoïdes ayant une membrane perméable et de donner un indice d'intégrité membranaire et de viabilité.

- **le pourcentage de spermatozoïdes anormaux :**

L'inactivation du sperme (typiquement au formol) suivi de l'examen en microscopie à contraste de phase permet de déterminer la morphologie des spermatozoïdes sur la lame. Diverses colorations, dont le kit rapide Diff Quick®, permettent aussi d'observer la morphologie des spermatozoïdes.

Chez l'étalon, la proportion de spermatozoïdes anormaux doit être inférieure à 35 % **(AMANN et al., 2011)**. Les anomalies primaires, comme les anomalies de la tête ou de la pièce intermédiaire, sont le signe d'une dysfonction de la spermatogenèse tandis que les anomalies secondaires, comme les anomalies de la queue ou les gouttelettes distales sont l'expression d'erreurs de récolte (par exemple, le suremploi de l'étalon, qui mène à l'apparition de gouttelettes cytoplasmiques distales par manque de maturation épididymaire) ou d'erreurs de conservation du sperme comme un choc thermique **(PICKETT et al., 1993 ; AMMAN et al., 2011).** Les analyseurs automatiques de sperme permettent aussi d'analyser la morphologie mais les résultats diffèrent encore trop souvent des observations à l'examen visuel **(GRAVANCE et al., 1997).**

- L'examen au Diff-Quick® permet en outre d'identifier les cellules d'origine inflammatoire ou les cellules somatiques provenant de la desquamation du tractus génital.

- **La concentration :**

L'importance de la mesure de la concentration est liée au nombre de juments que l'étalon peut féconder et donc, la fertilité.

Elle était classiquement déterminée par le comptage cellulaire sur **hématimètrie.**

C'est la seule méthode directe ou on peut vraiment voir les spermatozoïdes mais aussi avec le plus haut coefficient de variation **(RIGBY et al., 2001)** car plusieurs facteurs de variabilité ont été observés :

- technique du laboratoire ;
- Type de chambre de comptage ;
- Méthode de mixage ;
- Technique de pipetage ;
- Le technicien**.**

- **Composition chimique**

La composition chimique du sperme est la suivante : **(ALLIMANT, 2010)**

- eau (80%)
- matière organique (6%)

- ions (calcium, phosphate…)
- lipides
- glucides (fructose)
- albumines et globulines
- bases aminées

c. Nouveaux contrôles de qualité :

Les contrôles de qualité actuels reposent sur le postulat qu'un spermatozoïde progressif est de bonne qualité et que, par conséquent, il pourra féconder l'ovocyte. Cependant, une fois arrivé à l'ovocyte, le spermatozoïde va devoir utiliser d'autres organites pour accomplir d'autres fonctions : se fixer sur l'ovocyte, traverser la zone pellucide, fusionner et libérer une information génétique non altérée.

Diverses structures du spermatozoïde ont été étudiées :

on peut citer l'intégrité de l'acrosome **(OLIVEIRA et al., 2010)**, l'intégrité de l'ADN (**BAUMBER et al., 2003),** la fonction mitochondriale **(ORTEGA et al., 2009),** l'intégrité membranaire (**OLIVEIRA et al., 2010)** et les indices morphométriques qui évaluent la forme géométrique du spermatozoïde **(GRAVANCE et al., 1997).** L'analyse par cytométrie de flux permet de standardiser l'interprétation de la fluorescence émise par les sondes moléculaires spécifiques aux différentes parties du spermatozoïde **(VARNER, 2008).**

Le recours à ces techniques permet d'augmenter le nombre de paramètres étudiés dans le spermogramme en donnant un aperçu plus complet de la qualité du sperme. Ces méthodes ont déjà montré un grand intérêt clinique : chez l'homme, la fragmentation de l'ADN est reliée à la fertilité du sperme **(EVENSON, 2000**) et chez le cheval le potentiel des mitochondries dans le sperme frais permet de prévoir la qualité du sperme après décongélation **(ORTEGA et al., 2009).** Cependant, les valeurs seuils de chaque test ne sont pas fixées et les seules observations cohérentes se font en comparant un individu de fertilité inconnue à un individu de fertilité connue **(MORREL, 2006),** ce qui limite les comparaisons entre équipes et même entre analyses.

II. L'étude de la concentration du sperme épididymaire :

II.1. La cytométrie de flux :

L'utilisation de la **photométrie** a facilité la détermination de la concentration, mais certains biais existent si le sperme était contaminé par d'autres types cellulaires. De plus, cette méthode n'était pas utilisable pour du sperme dilué dans un milieu opaque, comme les milieux de congélation à base de lait (JOHANSON et al., 2008).

II.2. les cellules hématimètrique :

1. Cellule de thomas :

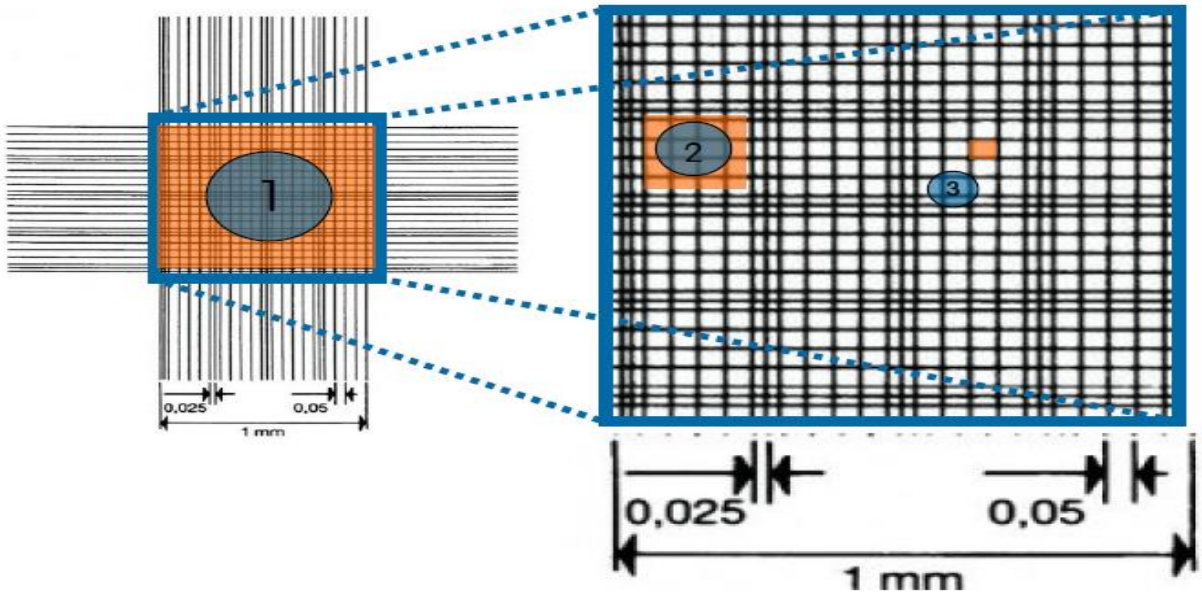


Figure 6 : Carré d'une cellule de thomas (www.celeromics.com)

*** formule de la cellule de Thomas :** (www.celeromics.com)

CARRE 1 :

Aire = 1 mm x 1mm = 1 mm2 Volume = 1 mm2 x 0,1 mm = 0,1 mm3 = 1 x 10-4 ml

1

$$\text{Concentration cellulaire} = \frac{\text{Cellules totales comptées}}{\text{Nombre de carrés}} \times 10.000$$

CARREE 2 :

Aire = 0,2 mm x 0,2 mm = 0,04 mm2

Volume = 0,04mm2 x 0,1 mm = 4 x 10-3 mm3 = 4 x 10-6 ml

2

$$\text{Concentration cellulaire} = \frac{\text{Cellules totales comptées}}{\text{Nombre de carrés}} \times 250.000$$

CARRE 3 :

Aire = 0,05 mm x 0,05 mm = 0,0025 mm2

Volume = 0,0025mm2 x 0,1 mm = 2,5 x 10-4 mm3 = 2,5 x 10-7 ml

3

$$\text{Concentration cellulaire} = \frac{\text{Cellules totales comptées}}{\text{Nombre de carrés}} \times 4 \times 10^6$$

2. **Cellule de malassez : (voir la partie expérimentale)**

II.3. La coloration nucléaire :

La coloration nucléaire à l'iodure de propidium après lyse membranaire et la détermination électronique du nombre de noyaux colorés représente actuellement la méthode la plus rapide et la moins biaisée **(JOHANSON et al., 2008).**

Dans le sperme frais, la concentration en spermatozoïdes est habituellement comprise entre 150 et 300 x 10^6 spermatozoïdes/ml **(PICKETT, 1993).**

Cependant, la concentration dépend du volume de plasma séminal émis par les glandes annexes : l'excitation sexuelle augmente la sécrétion des vésicules séminales, en augmentant le volume et en diminuant proportionnellement la concentration **(MAGISTRINI et al., 1987 ; PICKETT, 1993 ; SIEME et al., 2004).**

Un éjaculat équin compte en moyenne 10 milliards de spermatozoïdes, ce nombre variant selon la fréquence et la répétition des récoltes **(MAGISTRINI et al., 1987 ; SIEME et al., 2004).**

Lors du processus de congélation, le culot cellulaire obtenu après centrifugation peut être plus ou moins dilué avec le milieu de congélation.

La concentration du sperme congelé dépend donc des options de commercialisation choisies lors de la production, mais aussi de la contrainte technique imposée par le milieu de congélation. En effet, si l'on utilise des milieux de congélation contenant de basses concentrations en agent cryprotecteur, il faudra minimiser le rapport entre le volume du milieu de congélation et le volume du culot cellulaire afin que la concentration en agent cryoprotecteur ne soit pas trop basse dans la dilution finale.

Le producteur peut donc définir sa dose de sperme congelé comme étant de huit paillettes de 0,5 ml (norme française, avec des concentrations en agent cryprotecteur basse dans le milieu de congélation) ou de quatre paillettes de 0,5 ml (normes allemande et américaine, avec des milieux de

congélation plus concentrés en agent cryoprotecteur), avec des concentrations respectives 100 ou 200 x 10^6 spermatozoïdes/ml **(SAMPER, 2001 ; VIDAMENT, 2005)**.

Il est conseillé d'inséminer avec des doses contenant au moins 400 x 106 spermatozoïdes **(VIDAMENT, 2005).**

II.4. le spectrophotomètre :

1. Définition d'un spectrophotomètre

Le spectrophotomètre est un appareil qui mesure l'absorbance d'une solution à une longueur d'onde donnée. Un dispositif monochromateur permet de générer à partir d'une source de lumière visible ou ultraviolette une lumière monochromatique dont la longueur d'onde est choisie par l'utilisateur. La lumière monochromatique incidente d'intensité I_0 traverse alors une cuve contenant la solution étudiée, puis l'appareil mesure l'intensité I de la lumière transmise.**(HENKEL, 1978)**

- Le domaine spectral concerné est subdivisé en trois plages :
  - Ultraviolet : 200nm-400nm.
  - Visible : 400nm-750nm.
  - Proche infrarouge : 750nm-1400nm. **(SKOOG et al., 2007**)

2. Absorbance d'une substance :

L'absorbance A d'une substance chimique (sans unité) dépend en général de :

- La nature de la solution étudiée.
- La longueur d'onde sous laquelle elle est analysée.
- La concentration de cette substance.

L'absorbance mesure la capacité d'un milieu à absorber la lumière qui le traverse.
(HENKEL, 1978)

3. Loi d'absorption moléculaire : loi de BEER-LAMBERT

Lorsqu'une lumière d'intensité I_0 passe à travers une solution, une partie de celle-ci est absorbée par le soluté. L'intensité de la lumière transmise est donc inférieure à I_0. On définit l'absorbance de la solution comme suit :

$A=\log (I_0 / I)$

On parle aussi de transmittance définie par la relation :

$T= I / I_0$ c'est-à-dire $A= -\log T$

L'absorbance est une valeur sans unité. Elle est d'autant plus grande que l'intensité transmise est faible.

La relation de Beer-lambert décrit qu'à la longueur d'onde λ donnée, l'absorbance d'une solution est proportionnelle à sa concentration et à la longueur du trajet optique.

Alors pour une solution limpide contenant une seule substance absorbante :

$$\mathbf{A_\lambda = \varepsilon_\lambda . L.C}$$

- A_λ est l'absorbance de la solution pour une longueur d'onde λ.
- C (en mol^{-1}) est la concentration de la substance absorbante.
- L (en cm) est la longueur du trajet optique.
- ε_λ(en $L.mol^{-1}.cm^{-1}$) est le coefficient d'absorbance. **(HENKEL, 1978)**

➢ **Condition de validité de loi BEER-LAMBERT :**

La loi de Beer-Lambert n'est vérifiée rigoureusement que sous les conditions suivantes :

- la lumière utilisée doit être monochromatique car selon **(BURGOT et al., 2006),** une bande passante de lumière incidente trop large (lumière insuffisamment monochromatique) entraine imprécision sur la valeur de coefficient d'absorption qui se traduit par un écart à la linéarité.
- La solution ne doit pas être concentrée sinon risque de réflexion.
- La solution ne doit pas être fluorescente : pas de réémission de lumière dans toutes les directions.
- La solution doit être limpide (pas de précipité ou de trouble qui entrainent une diffusion de la lumière) et homogène **(AUDIGIE et al., 1995**)

4. Principe de fonctionnement du spectrophotomètre

Le spectrophotomètre est un appareil équipé d'un diapositif analysant le rayonnement.
Tous les composants optiques doivent être transparents dans la gamme spectrale employée.

Le spectrophotomètre est composé de :

- Source de lumière blanche : traverse le monochromateur ;
- Système dispersif : (souvent conçu comme monochromateur) muni d'une fente capable de sélectionner une lumière monochromatique incidente tombant sur une cuve porteuse d'échantillon ;
- Système détecteur : convertit l'intensité lumineuse transmise en un signal électrique ;
- Amplificateur : un analyseur qui traite le signal électrique et affiche la valeur de l'absorbance. (HENKEL, 1978)

5. L'étalonnage du spectrophotomètre :

L'étalonnage du spectrophotomètre, permet de connaitre la relation entre la concentration de sperme épididymaire, mesuré à l'aide d'une cellule hématimètrique, et la D.O. lue sur l'appareil. Cette relation mathématique est de forme :

[C]=A x (D.O.) +B

Ou [C] est la concentration, A et B étant les inconnues constantes et propres à chaque appareil.

La concentration donnée par une cellule hématimètrique est une mesure directe et précise (visualisation et comptage des spermatozoïdes).

La concentration donnée par le spectrophotomètre reste une approximation mathématique indirecte et doit être vérifiée régulièrement par un comptage à la cellule hématimètrique :

- Lors de l'acquisition d'un nouvel appareil (chaque appareil est différent d'un autre même s'il est de la même marque),
- Chaque début de saison de monte (usure de l'ampoule),
- Lors d'un changement de l'ampoule (changement des caractéristiques du rayon lumineux),

Partie Expérimentale

Matériel et méthode

I. Matériels et méthodes :

I.1. Echantillons :

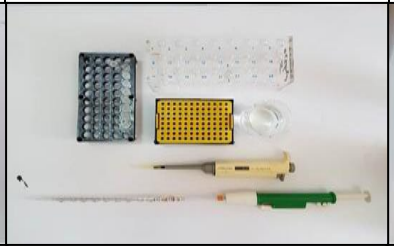
76 échantillons ont été prélevés d'étalons d'âge différents après abattage au sein de l'abattoir d'EL HARRCH (la wilaya d'Alger), dans la période étendue du **11/02/2018** au **13/03/2018.**

Le sperme prélevé après dissection est récolté dans des Eppendorf au niveau des laboratoires de physiologie et d'embryologie (ENSV) département préclinique.

Figure 7 : Organes génitaux d'étalons à l'abattoir d'EL-HARRACH –Alger- (photo personnelle)

I.2. Matériels :

Tableau 1 : Matériels utilisés au laboratoire (photo personnelle)

Pour dissection	**Pour dilution**	**Pour lecture**
Plateau Ciseau Pince à dent de souris Lame bistouri Pince hémostatique Cathéter	Na Cl formolé Tubes Micropipette Vortex	Microscope optique Cellule de malassez Spectrophotomètre
		

II. Méthodes :

II.1. De dissection

- **Technique de flush rétrograde :**

La technique est décrite chez le chat mais peut aussi être réalisée chez l'étalon et le chien. La récolte des spermatozoïdes provenant de l'épididyme nécessite une dissection fine du canal déférent et exige soit la cannulation de l'épididyme en place sur l'animal soit le retrait chirurgical de celui-ci.

Le moyen le plus efficace de récupérer le maximum de spermatozoïdes reste le retrait chirurgical des épididymes. Lors de la castration, il est impératif de conserver l'épididyme et le canal déférent intacts. Il faut réaliser une ligature le plus haut possible sur le canal déférent, de façon à perdre le moins possible de spermatozoïdes. L'idéal est de réaliser la castration avant l'euthanasie de l'animal car les effets de l'euthanasie sur la viabilité des spermatozoïdes n'ont pas encore été établis.

Directement après exérèse, le testicule est placé dans une solution saline isotonique, à température ambiante, supplémentée en pénicilline (100 UI/ml) et streptomycine (0,1 mg/ml).

Le transport doit être réalisé dans un container réfrigéré. En effet, il a été démontré que de la semence conservée pendant 24 heures à 5°C reste viable (BRUEMMER 2006 ; SIMPSON et al, 1998).

Malgré le traumatisme que subissent les spermatozoïdes lors de leur sortie, cela n'altère pas significativement leur viabilité.

Cette technique donnerait de meilleurs résultats que la précédente. En effet, elle permettrait la collecte de 15 à 20 milliards de spermatozoïdes contre 4 à 5 avec la méthode de flottaison chez l'étalon.

C'est une technique facile à mettre en œuvre mais qui demande de la pratique car la cathétérisation du canal déférent n'est pas aisée (BRUEMMER, 2006).

Remarque : pour notre étude, on a injecté de l'air à la place du lait commercial ce qui donne les

mêmes résultats.

Plus simplement, une autre méthode peut être utilisée. Elle consiste à écraser ou hacher finement l'épididyme et le canal déférent et récupérer la semence (ZAMBELLI et al, 2006). Les caractéristiques du sperme prélevé par flush de l'épididyme diffèrent de celui prélevé par les autres

techniques car les spermatozoïdes n'ont pas tous terminé leur maturation. Le spermogramme révèle ainsi une augmentation relative des anomalies primaires, telles que les gouttelettes cytoplasmiques distales, survenues lors de la spermatogenèse, car les spermatozoïdes défectueux sont normalement éliminés lors de leur transit épididymaire. On observe également une réduction des anomalies secondaires, telles que des anomalies de la queue, car celles-ci surviennent lors du transit épididymaire (**AXNER et al, 1998).** Cependant, la viabilité et la fertilité des spermatozoïdes issus de l'épididyme ne semblent pas différentes de celles de spermatozoïdes éjaculés (**MONTERIO et al, 2011).**

Dans notre étude on a procédé comme suit :

- A l'aide d'un ciseau, on coupe la gaine vaginale pour extérioriser le testicule et l'épididyme.
- On dissèque l'épididyme pour individualiser les tubes séminifères.
- On place la pince hémostatique sur le canal déférent.
- On cathéterise le canal ; à l'aide d'une seringue sans aiguille, on introduit l'air.
- Apres avoir gonflé les tubes ; on fait une incision au niveau de la queue pour récupérer le sperme dans un eppendorf.
    - ❖ l'incision doit se faire sur un endroit peu vascularisé pour éviter l'écoulement du sang qui est spermicide, et qui peut fausser les résultats.(figure 8)

Figure *8*: Etapes suivies pour la dissection des testicules *(*photo personnelle*)*

II.2. De dilution :

- Préparation du Na CL formolé : 1l d'eau distillé + 1 ml de formol + 9gr de NaCl.(figure 9).

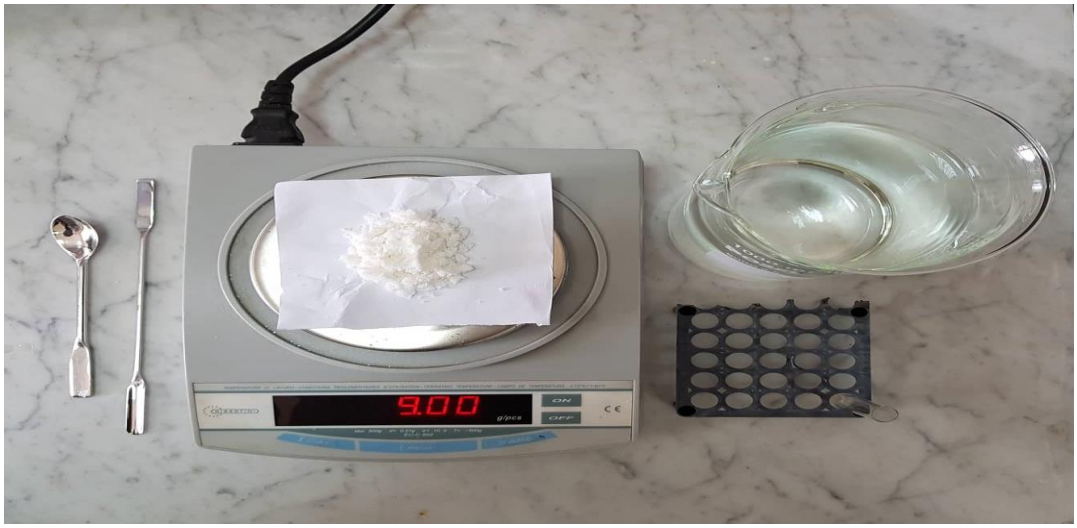


Figure 9 : Les composants de Na Cl formolé (photo personnelle)

- Dilution de 1/1000 : à l'aide d'une micro pipette on prend 5 Ul du sperme et on la met dans 5 ml de NaCl formolé.
- Dilution 1/1200 : à l'aide d'une micro pipette on prend 5 Ul du sperme et on la met dans 6 ml de NaCl formolé.(figure 10)

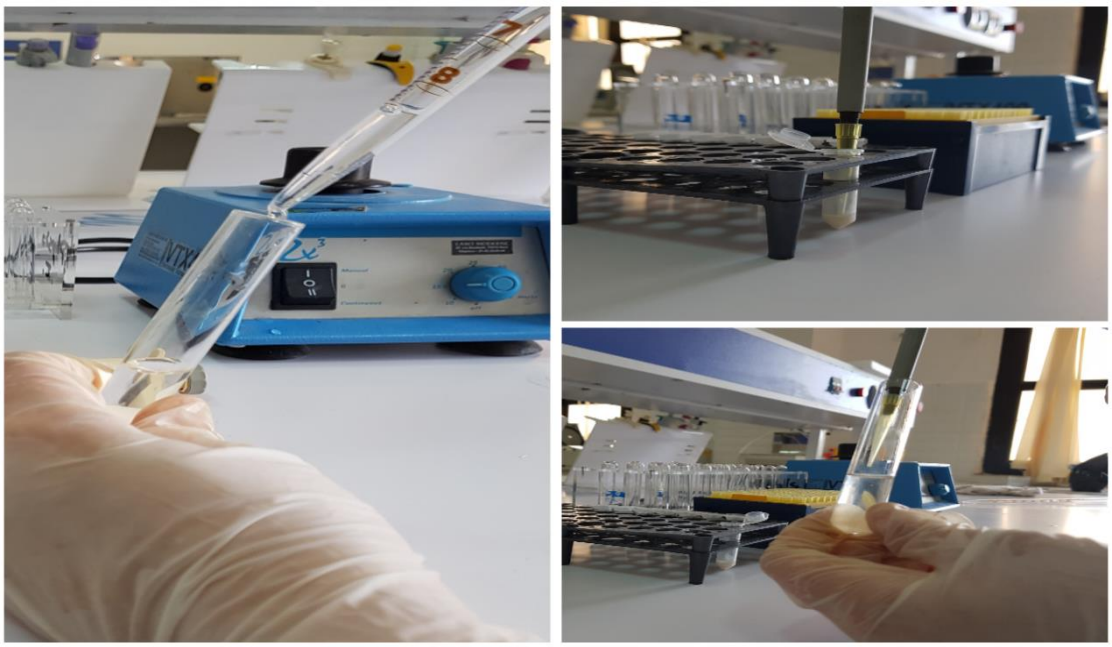


Figure 10 : Technique de dilution (photo personnelle)

II.3. De lecture :

II.3.1. Par cellule de malassez

- La solution est déposée sur la lame de malassez à l'aide d'une micropipette afin de remplir par capillarité,
- 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.
- Apres repérage des limites de la cellule (grossissement x 100), les éléments sont comptés au microscope au grossissement x400. la lame est balayée de façon méthodique, de gauche à droite ou de 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 formants la lettre L.
- Mesurer leur concentration exacte à la cellule hématimètrique (2 comptages par cuve)

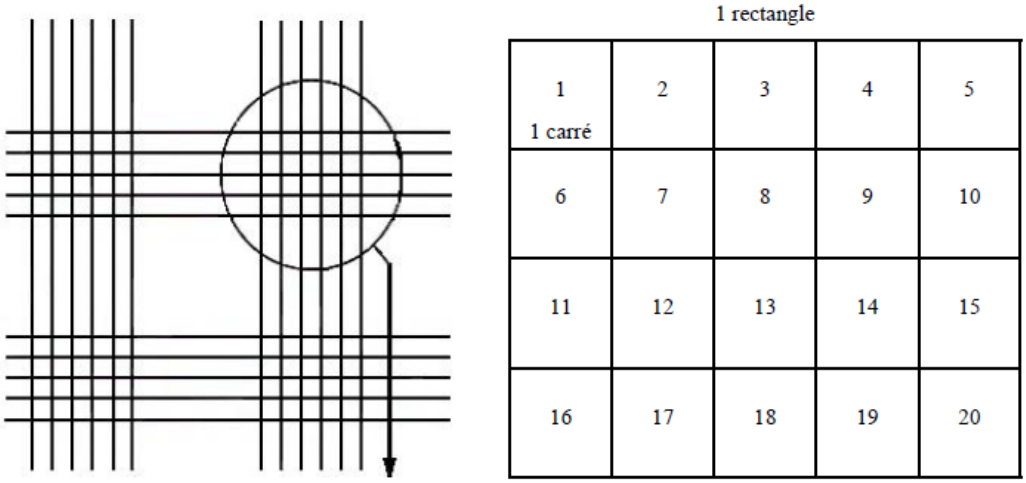


Figure 11 : Rectangle d'une cellule de malassez (DIDACTIK - PIERRON Éducation)

-**Description** :

La cellule possède 25 rectangles composés chacun de 20 carrés Chaque carré élémentaire a 1/20 mm de côté, soit une surface de 1/400 mm².

Chaque rectangle correspond à 1/20 mm².

- L'écartement entre la lamelle et la lame est de 1/5 mm par construction (profondeur).
- profondeur 1/5 mm.

- surface d'un carré 1/20 x 1/20 = 1/4000 mm²
- volume du parallélépipède 1/5 x 1/400 = 1/2000 mm^3
- 1 rectangle 4 x 5 = 20 rectangles.
- volume du parallélépipède correspondant 20 x 1/2000 = 1/100 mm^3
- volume de la cellule 100 x 1/100 = 1 mm^3

Mode opératoire :

-
- Agiter la suspension de spermatozoïdes pour la rendre plus homogène
- Prélever à la pipette 1 ml de suspension et déposer rapidement (afin d'éviter toute sédimentation) une goutte sur la cellule de Malassez
- Recouvrir d'une lamelle rigide que l'on pose fermement contre les deux zones de support de la cellule
- La combinaison oculaire - objectif doit réaliser un grossissement d'environ 500 fois, de sorte que l'on voit entièrement dans le champ un rectangle de cellule composé de 20 carrés pour la cellule de Malassez. Amener dans le champ microscopique un rectangle composé de 20 carrés et compter les cellules qui s'y trouvent.
- -Opérer ainsi pour 5 rectangles disposés en diagonale dans la cellule de Malassez, et prendre la moyenne des résultats.

Remarque :

- Si la concentration spermatozoïdes est trop élevée (plus de 200 cellules par champ), on fera au préalable une dilution au 1/10 ou au 1/100 si nécessaire en prenant soin d'éviter les erreurs dues à la sédimentation.

II.3.2. Par spectrophotomètre :

Les mesures par spectrophotomètres se font après son étalonnage qui se fait comme suit :

- ❖ Mesurer la D.O. à différentes longueurs d'onde à partir d'un seul échantillon pour trouver celle qui a une correspondance optimale maximale.
- ❖ dans notre étude on a mesuré la D.O. à partir de 7 longueurs d'onde, comme le démontre le graph ci-dessous.

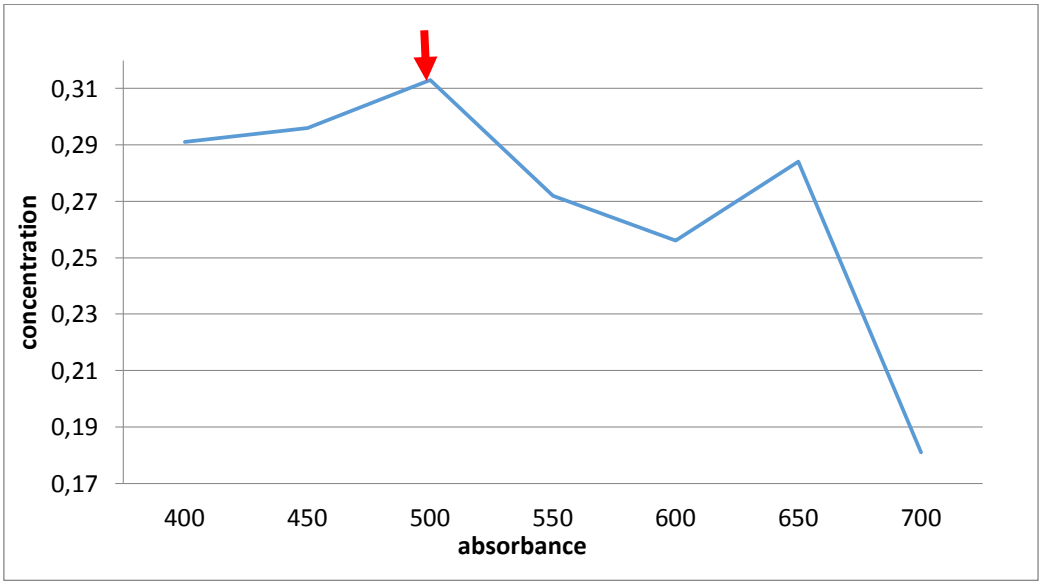


Figure 12: mode de comptabilité de la longueur d'onde.

D'après le graph, la valeur qui correspond le mieux à notre étude et celle qu'on a prise comme référence est égale à 500 nm.

- Etablir un graphique pour visualiser les éventuelles anomalies (points aberrants), pour les deux dilutions faites ;

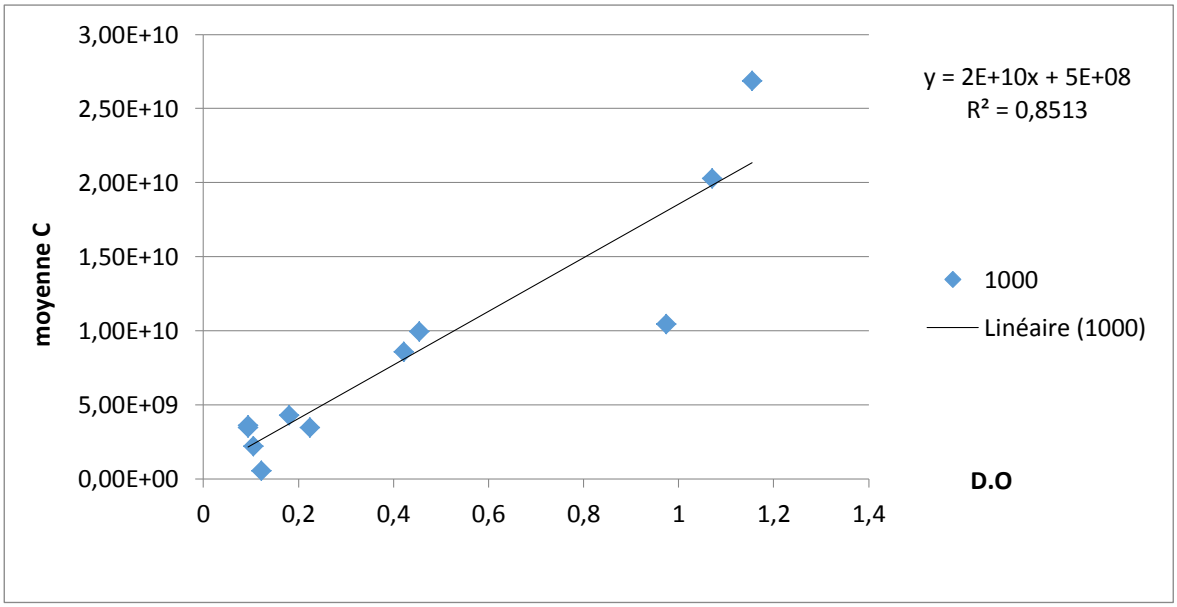


Figure 13 : courbe de dilution 1/1000 avant correction

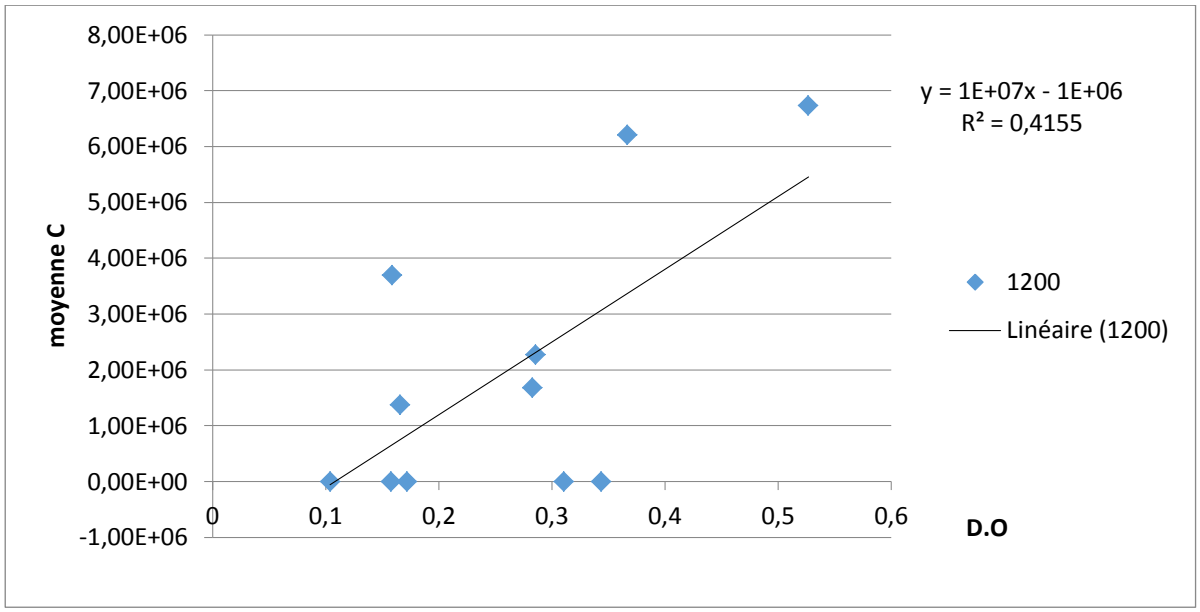


Figure 8: courbe de dilution 1/1200 avant correction

- Voir les échantillons éliminés dans les tableaux annexes.

Résultats et discussion

I. Résultats :

- Après correction nous avons obtenu les deux graphs des deux dilutions 1/1000 et 1/1200 correspondant à Y1 et Y2 respectivement, en sachant que la correction se fait en enlevant les points aberrants de manière à-ce-que le R^2 se rapproche le plus du 1.(figure 15)

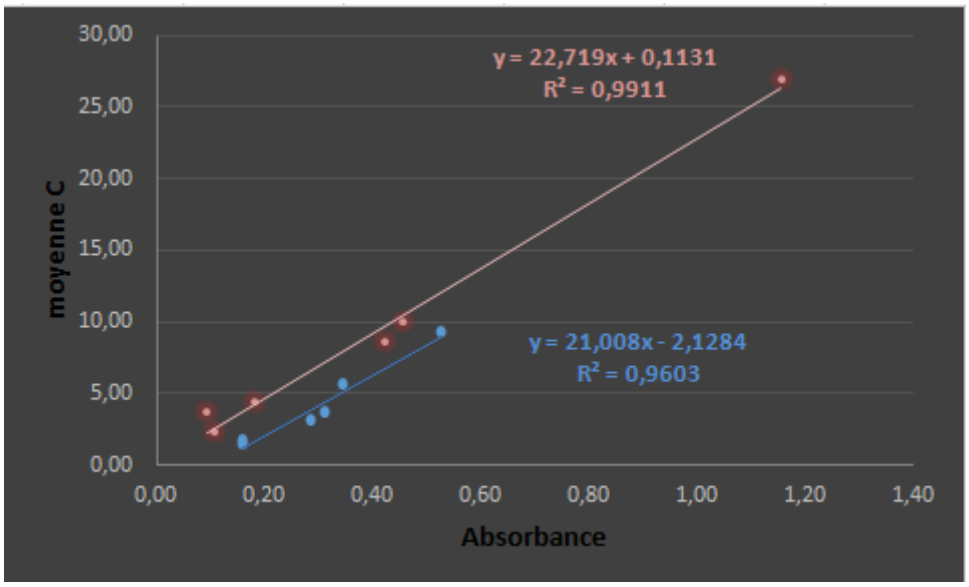


Figure 15: courbe de dilution 1/1000 et 1/1200 après correction

À partir des points tracées nous avons trouvé une courbe linière dont l'équation **Y1=ax1+b (=22,719x + 0,1131)** et **Y2=ax2+b (=21,008x - 2,1284)** correspondant aux dilutions 1/1000 et 1/1200 respectivement et qui permet de prédire les concentrations (y) à partir des absorbances (x)

- Il apparait, d'après la valeur du coefficient de détermination (**R^2=0,97** et **0.99** pour D1 et D2) et du coefficient de corrélation correspondant (**r = 0.98** et **r=0.99** pour D1 et D2) que les valeurs obtenues par les deux méthodes sont très corrélée entre elles. Des résultats similaires ont été trouvés par de nombreuses études antérieures ayant comparé les deux méthodes chez de nombreuses espèces. A titre d'exemple, chez les abeilles, (HARBO, 1975) a signalé une corrélation élevée (r=0.995) entre les deux méthodes. Chez le bovin, dans son étude comparative entre plusieurs méthodes d'estimation de la concentration en sperme de 50 éjaculats prélevés de 13 taureaux, (PRATHALINGAM et al., 2006) a signalé un r = 0.99 entre les deux méthodes.

- A partir de cette courbe, on peut conclure qu'il y a une similarité entre la méthode spectrophotométrique et la méthode hématimètrique pour l'analyse de la concentration spermatique ce qui rend la méthode spectrophotométriques une méthode alternative pour l'analyse de la concentration spermatique.

Pour déterminer la relation mathématique [C] = A x (D.O.) + B il existe 3 méthodes :

Méthode1 :

A l'aide d'une machine à calculer scientifique, en rentrant les couples de chiffre (D.O. et [C]) et en utilisant la fonction statistique **régression linéaire**, la machine détermine les deux constante A et B.

Méthode 2 :

Utiliser un tableau qui permet de visualiser les points d'étalonnage, (voir annexes)

Mettre en surbrillance les 2 colonnes de chiffres, choisir le graphique type **nuage de points**.

- Cliquer sur le graphique, puis faire **graphique / ajouter une courbe de tendance,** cocher type **linéaire** et cocher **option / afficher l'équation sur le graphique et afficher le coefficient de détermination R^2 sur le graphique.**
- Ensuite prendre la racine carrée pour avoir R.

➢ C'est cette méthode qui a été utilisée, et ces mêmes étapes qui ont été suivis pour élaborer les graphs précédents.

Méthode 3 :

A l'aide d'un graphique par approximation, tracer une droite au milieu du graphique avec, si possible, autant de points au-dessus qu'en dessous. Utiliser les insertions de cette droite avec l'axe horizontal (D.O.) et l'axe vertical ([C]) pour déterminer les deux constantes A et B grâce au calcul suivant :

- Soient X_0, le point ou la droite coupe l'axe horizontal (D.O) et Y_0, le point ou la droite coupe l'axe vertical ([C]).
- Quand X= 0, Y=Y_0 ; on peut écrire : $Y_0 = A \times 0 + B$, soit $B = Y_0$.
- Quand Y= 0, X=X_0 ; on peut écrire : $0 = A \times X_0 + B$, soit $B = Y_0$.
- Donc $0 = A \times X_0 + Y_0$ et $A = -Y_0 / X_0$. **(Les haras nationaux, 2014)**

- **Test de Fisher :**

Une fois les deux formules obtenues **Y1=ax1+b (=22,719x + 0,1131)** et **Y2=ax2+b (=21,008x - 2,1284)**, on a fait un test de comparaison pour voir si la différence était significative ou pas (voir test de Fisher annexes), le tableau ci-dessous démontre nos résultats :

Tableau 2 : Résultat du test de Fisher

$\sigma^2 rs1$	0,460643204
$\sigma^2 rs2$	0,048491914
Fc =	9,499381791
Ft =	6,388232909
Vedict :	Différence Significative

D'après ce qu'on a trouvé, il existe une différence significative, ce qui signifie qu'on ne peut pas utiliser une même formule pour deux dilutions différentes mais chacune a sa propre formule, nous avons opté pour notre étude pour la dilution 1/1200 qui nous semblait aisée et plus applicable pour nos échantillons.

II. Discussion :

Dans cette étude, 76 testicules ont été prélevés de chevaux barbes après abattage ayant 10 ans de moyenne d'âge. Après récolte du sperme épididymaire avec la technique du flush rétrograde et l'analyse de la concentration avec la cellule de Malassez puis par la mesure de la densité optique ; la concentration du sperme épididymaire obtenue était de : **$1{,}19x10^{10}$** spz/ml en moyenne, en utilisant la dilution 1 :1200

Une étude similaire pratiquée sur 82 testicules prélevés sur des étalons matures après castration en utilisant la technique de flush rétrograde, ont obtenus une moyenne de **$6.5\pm0.4x10^{9}$** spz/ml**(VIEIRA et al., 2013)**

En raison d'un manque d'informations concernant la capacité de stockage de l'épididyme et la concentration de spermatozoïdes qui peuvent être obtenu à partir de la queue de l'épididyme, des scientifiques ont corrélé le volume testiculaire (longueur × largeur × hauteur) et le poids testiculaire avec la récupération de spermatozoïdes épididymaire.
Les testicules ont été obtenus pendant la castration de vingt-deux chevaux de saut d'obstacles brésiliens d'environ 3 ans, le sperme épididymaire est récupéré par la technique d'injection d'un dilueur.
Ils ont pu d'après ces résultats estimer la concentration du sperme épididymaire à : **$103.5 \pm 78.1x10^{6}$ spz/ml (PAPA et al, 2008)**

Les auteurs **BRUEMMER, 2006** et **MONTERO, 2013** ont pu déterminer la différence entre la concentration des spermatozoïdes dans les différents segments de l'épididyme, c'est-à-dire, la tête, le corps et la queue, sur 46 chevaux de race Azteca âgés de 1 à 2 ans en utilisant des mesures d'évaluation de routine.
Ils ont trouvé que la concentration dans la queue de l'épididyme atteint les : **$1.34x10^{6}$ spz/ml** et dans d'autres études, ils ont pris le nombre total de spermatozoïdes / mL comme unité de mesure mais ils ne rapportent pas le nombre total de mL utilisés pour effectuer l'évaluation.

Les différences rapportées pour la concentration du sperme épididymaire dans ces autres études peuvent être attribuées aux différences d'âge des animaux et / ou des températures corporelles et des techniques utilisées.

L'âge des animaux et l'effet individuel doivent être considérés comme des variables importantes (**LEME, 2012)**

Deux autres études effectuées dans les mêmes conditions et avec la même méthode ont été réalisé au sein de notre établissement (ENSV) mais sur des espèces différentes, qui confirment l'efficacité de la spectrophotométrie :

- La 1ere étude était effectuée sur 13 semences de dindons âgés de 28 semaines et 8 semences de dindons âgés de 56 semaines.**(DEBOUZ et al., 2012)**
- La 2eme étude était effectuée sur 5 bovins et 3 ovins, ils ont réussis à établir une formule qui permettait de déduire la concentration du sperme épididymaire a partir de la densité optique, seulement ils ont utilisé l'huile de paraffine à la place de l'air dans la technique de flush rétrograde.**(REBZANI et al., 2015)**

Conclusion

Conclusion :

A terme de notre travail, on conclue que la spectrophotométrie est une méthode très efficace, rapide, sensible et précise, elle permet aussi de calculer un nombre très élevé de concentration par rapport à la lame de malassez qui a un grand intérêt malgré qu'elle présente quelques inconvénients sur les plans rapidité et précision ,en raison de facteur humain qui augmente la probabilité des erreurs.

La spectrophotométrie nous permet de calculer la concentration du sperme épididymaire à l'aide d'une formule calculée préalablement, ce qui la rend plus pratique dans le domaine de la reproduction vétérinaire et plus précisément au niveau des stations de monte pour le calcul rapide de la concentration afin de connaitre exactement le nombre de paillettes à produire pour chaque éjaculat.

Liste des références

Liste des références

- **ALLIMANT M, 2010**. Actualités sur les méthodes d'évaluation de la qualité de la semence de l'étalon. Thèse de doctorat vétérinaire, Université Claude- Bernard, Lyon, page 138.

- **AMANN R, GRAHAM K, 2011**. Spermatozoal function. 2nd edition.

- **AUDIGIE C, DUPOINT G, ZONSZAIN F, 1995**. principes des méthodes d'analyses biochimiques. Tome I. Edition DOIN .page 112-113.

- **AXNÉR E, HERMANSSON U, LINDE-FORSBERG C, 2004.** The effect of Equex STM paste and sperm morphology on post-thaw survival of cat epididymal spermatozoa. Anim. Reprod. Sci. Vol. 84, n° 1-2, pages : 179-191.

- **BARONNE R, 2001**. Appareil génital mâle. In: Anatomie compare des mammifères domestiques. Tome 4. Splanchnographie II. Edition Vigot 2001. page 83-250.

- **BAUMBER J, BALL B, LINFOR J, MEYERS A, 2003**. Reactive oxygen species and cryopreservation promote DNA fragmentation in equine spermatozoa. J. Androl., 2003, 24, Pages 24, 621-628.

- **BERNARD C, 2003**. Anatomie du cheval, Edition DEROUAUX ORDINA, page 338-349,

- **BJORNDAHL L, SODERLUNDI, KVIST U, 2003**. Evaluation of the one-step eosin-nigrosin staining technique for human sperm vitality assessment. Hum. Reprod., 18. Pages : 813-816.

- **BLANCHARD TL, VARNER D, SCHUMACHER J, LOVE CH.C, BRINSKO S.P, RIGBY.S.L**, Manuel de reproduction équine traduit et adapté à la 2eme édition Américaine, .Edition MALOINE 2005,page 193-195.

- **BOERKE A, TSAI P.S, GARCLAGIL N, BREWIS I.A, GADELLA B.M, 2008**. Capacitation-dependent reorganization of microdomains in the apical sperm head plasma

membrane. Functional relationship with zona binding and the zona-induced acrosome reaction. Theriogenology, 70, pages : 1188-1196.

- **BURGOT G, BURGOT l, 2006**. méthodes instrumentales d'analyses chimiques et applications. Edition LAVOISIER. Pages 224-226.

- **BRUEMMER E. 2006**. Collection and Freezing of Epididymal Stallion Sperm. Vet. Clin. North Am. Equine Pract. Vol. 22, n° 3. Pages : 677-682

- **CHEVALIER F. C, 1980**. Contribution à l'étude de l'insémination artificielle du cheval. Thèse pour l'obtention du diplôme docteur vétérinaire. n°12, ENV Alfort, Créteil, page 91.

- **COLLIN B., 2003**. Anatomie du cheval.

- **DADOUNE J-P, DEMOULIN A, 2001**.Structure et fonction du testicule. In : La reproduction chez les mammifères et l'homme. INRA Editions.

- **DEBOUZ O ; BOUHLA S ; BACHI S ; 2015**. L'utilisation du spectrophotomètre pour la détermination de la concentration spermatique pour l'éspèce Dinde. Thèse pour l'obtention du diplôme docteur vétérinaire.ENSV.

- **EVENSON D., JOST L**. Sperm chromatin structure assay is useful for fertility assessment. Methods Cell Sci., 2000, 22. Pages : 169-189.

- **FALOMO M ; ROSSI M ; MANTOVANI R ; 2016**. Collection, storage and freezability of equine epididymal spermatozoa. Italian Journal of Animal Science 15:3, DOI10.1080/1828051X.2016.1210485 , pages : 386-389

- **GADELLA B.M, 2008**. Sperm membrane physiology and relevance for fertilization107. Pages, 229-236.

- **GRAVANCE C.G, CHAMPION Z, LIU I.K, CASEY P.J, 1997**. Sperm head morphometry analysis of ejaculate and dismount stallion semen samples. Anim Reprod Sci 47. Pages :149-155.

- **HENKEL J, 1978**. Essentials of drug product quality. The mosby company. pages 130-133.

- **HEYMON Y, Vignon X, 2005**. Reproduction des animaux d'élevage. Edition Educagri.

- **HOOGEWIJS M, RIJSSELAERE T, DE VLIEGHER S, VANHAESEBROUCK E, DE SCHAUWER C, GOVAERE J, THYS M, HOFLACK G, VAN SOOM A, DE KRUIF A. 2010**. Influence of different centrifugation protocols on equine semen preservation. Theriogenology ; 74. Pages 118-126.

- **IMADE GE, TOWOBOLA OA, SAGAY AS, OTUBU JA. 1993**. Discrepancies in sperm count using improved Neubauer, Makler, and Horwells counting chambers. Arch Androl;31:17–22. Pages 31.

- **JOHANSON C.S, MATSSON F.C, LEHN-JENSEN H, NIELSEN J.M, PETERSEN M.M. 2008**. Equine spermatozoa viability comparing the NucleoCounter SP-100 and the eosin-nigrosin stain. Anim. Reprod. Sci., 107.Pages 325-326.

- **LEEB H, RENNHOFER G, 1954**. Ueber die Beurteilung der Vitalitat menschlicher Spermien mit der Eosin-Nigrosin-Farbung nach Blom. Wochenschr ; 104. Pages, 877-878.

- **LES HARAS NATIONAUX, 2014**. insémination artificielle équine, 5eme édition. Pages 146-148

- **LOPEZ-FERNANDEZ C, CRESPO F, ARROYO F, FERNANDEZ J.L, ARANA P, JOHNSTON S.D, GOSALVEZ, J. 2007**. Dynamics of Sperm DNA Fragmentation in Domestic Animals: II. The Stallion. Theriogenology, 68. Pages : 1240-1250.

- **MAGISTRINI M., 1990**. Techniques de conservation de la semence d'étalon. Elevage et Insémin ; 238 (juillet). pages 3-10.

- **MAGISTRINI M., CHANTELOUBE P., PALMER E. 1987**. Influence of season and frequency of ejaculation on production of stallion semen for freezing. J. Reprod. Fertil. Suppl. 35. Pages 127-133.

- **NOAKES D.E, PARKINSON TIMOTHY J. ET ENGLAND G.C, 2009**. Veterinary reproduction and obstetrics. Ninth Edition. Saunders Elsevier. Page : 961.

- **CAILLAUD M, ABELLAN C, MARION, 2014**. Insémination artificielle équine, le pin-au-haras, institut français du cheval et de l'équitation.

- **MONTEIRO G.A, PAPA F, ZAHN F.S, DELLAQUA J.A, C.M. MELO, R.R.D. MAZIERO, B.R. AVANZI. ALVARENGA, M.A. GUASTI P.N ; 2001**. Cryopreservation and fertility of ejaculated and epididymal stallion sperm. Animal Reproduction Science 127. pages 197– 201

- **MORREL J.M. 2006**. Update on semen technologies for animal breeding. Reprod. Domest. Anim ; 41. Pages, 63-67.

- **NICOLICH C., 1989**. L'insémination artificielle équine. Thèse pour l'obtention de diplôme docteur vétérinaire ; Nantes n° 22, ENV Nantes. page 205.

- **NISHIKAWA Y., 1959.** Studies of reproduction in horses. Tokyo, Japan: Japan Racing Association, Shiba Tamuracho Minatoku.

- **OLIVEIRA C.H, VASCONCELOS A.B, SOUZA F.A., MARTINSFILHO O.A, SILVA M.X, VARAGO F.C, LAGARES M.A. 2010**. Cholesterol addition protects membrane intactness during cryopreservation of stallion sperm. Anim. Reprod. Sci ; 118. Pages 194-200.

- **ORTEGA FERRUSOLA C, GARCIA B.M, GALLARDO BOLANOS J.M, GONZALEZ FERNANDEZ L, RODRIGUEZ MARTINEZ H, TAPIA J.A, PENA F.J, 2009**. Apoptotic markers can be used to forecast the freezeability of stallion spermatozoa. Anim. Reprod ; 114. Pages :393-403.

- **PAPA, F.O., MELO, C.M., FIORATTI, E.G., DELL'AQUA JR., J.A., ZAHN, F.S., ALVARENGA, M.A., 2008**. Freezing of stallion epididymal sperm. Anim. Reprod. Sci.107. page : 293.

- **PICKETT B.W., 1993**. Reproductive evaluation of the stallion. In Equine reproduction. Williams & Wilkins : Philadelphia. Pages 755-768.

- **PONTHIER J, TEAGUE S.R, FRANCK T, DE LA REBIERE DE POUYADE G, SERTEYN D, BRINSKO S.P, LOVE C.C, BLANCHARD T.L, VARNER D.D, DELEUZE S, 2013**. Effect of nonsperm cells removal with density gradient centrifugations on Myeloperoxidase concentration in post-thaw equine semen. Theriogenology ; 80. Pages : 1082-1087.

- **PONTHIER J, VAN DEN BERGHE F, PARRILLA-HERNANDEZ S, HANZEN C. et DELEUZE S, 2014**. Congélation du sperme dans l'espèce équine: état des lieux et perspectives.

- **REBZANI M ; RENNOU R ; 2015**. L'étalonnage du spectrophotomètre par cellule de malassez du sperme épididymaire de l'espèce bovine et ovine. Thèse pour l'obtention du diplôme docteur vétérinaire. ENSV

- **RIGBY S, VARNER D, THOMPSON J, LOVE C, BRINSKO S, BLANCHARD T, 2001**. Measurement of sperm concentration in stallion ejaculates using photometric or direct sperm enumeration techniques. Proc Ann Conv Am Assoc Equine Pract, 236-8. Pages: 47
- **SAMPER J.C ; 2001**. Management and fertility of mares bred with frozen semen. Anim. Reprod. Sci., 68 .Pages : 219-228.

- **SENGER P, 2005**. Pathways to pregnancy and parturition. Current Conceptions : Pullman. Page 373.

- **SIMPSON G, ENGLAND G.C, HARVEY M ; 1998** .Manual of small animal reproduction and neonatology. British Small Animal Veterinary Association. Gloucester (United Kingdom). Page :246.

- **SENGER J. 2012**. Pathways to Pregnancy and Parturition. 3 eme Edition
- **SIEME H, KATILA T, KLUG E , 2004**. Effect of semen collection practices on sperm characteristics before and after storage and on fertility of stallions. Theriogenology, , 61. Pages : 769-784.

- **SKOOG G, 2007**. principls of instrumental analysis. 6th edition. thomson brooks/coles.

- **TEMMIM S, 2015**. Support du cours 3eme année vétérinaire ENSV.

- **THIBAULT C, 2001**. La reproduction chez les mammifères et l'homme. Edition Ellipses.

- **TIBARY A, BAKKOWY M, 2005**. Reproduction équine. Tome II: l'étalon. Edition Actes.

- **VARNER D.D, 2008**. Developments in stallion semen evaluation. Theriogenology ; 70. Pages :448-462.

- **VIEIRA A, GADEA J, GARCIA -VAZQUEZ F, AVILES- LOPEZ K, MATAS C, 2013.** Equine spermatozoa stored in the epididymis for up to 96 h at 4 ◦C can be successfully cryopreserved and maintain their fertilization capacity. Animal Reproduction Science 136. Pages : 280– 288.

- **VIDAMENT M , 2005**. French field results (1985-2005) on factors affecting fertility of frozen stallion semen. Anim. Reprod. Sci.,89. Pages : 115-136.

- **ZAMBELLI D, PRATI F, CUNTO M, IACONO E, MERLO B. 2008** Quality and in vitro fertilizing ability of cryopreserved cat spermatozoa obtained by urethral catheterization after medetomidine administration. Theriogenology. Vol. 69, n° 4. Pages : 485-490.

Les sites web :

- (www.celeromics.com)

Liste des annexes

Tableau 03 : les échantillons étudiés.

			poids				D,O	
Echantillons	date	âge	volume	testicule	queue	observation	1/1200	concentration
E 1	11/02/2018	14	0,3	327,67	6,47		0,104	5,64E+07
E 2		14	0,9	354,7	8,32		0,367	5,58E+09
E 3		10	1	337,37	6,95	adherences	0,344	5,10E+09
E 4		10	1	364,88	6,49	adherences	0,725	1,31E+10
E 5	13/02/2018	12	0,1	337,71	6,51		0,456	7,45E+09
E 6		12	0,01	518,6	7,15		0,882	1,64E+10
E 7		10	0,3	228,1	8,25		0,582	1,01E+10
E 8		10	0,5	371,15	9,35		0,877	1,63E+10
E 9	15/02/2018	8	0,4	316,7	8,44		0,277	3,69E+09
E 10		8	0,7	227,18	7,18		0,716	1,29E+10
E 11		6	0,1	312,35	8,08		0,312	4,43E+09
E12		6	0,3	296,12	9,12		0,183	1,72E+09
E 13		8	0,1	318,07	6,35	monorchide	0,096	-1,12E+08
E 14	18/02/2018	10	0,5	367,43	7,527		0,286	3,88E+09
E 15		10	0,3	257,71	6,975		0,311	4,41E+09
E 16		13	0,8	355,1	7,36		0,159	1,21E+09
E 17		13	0,9	554,34	6,455		0,158	1,19E+09
E 18		8	0,4	362,14	5,275		0,283	3,82E+09
E 19		8	0,6	257,44	4,755		0,172	1,48E+09
E 20		6	0,1	335,71	5,418		0,166	1,36E+09
E 21		6	0,2	255,34	7,06		0,104	5,64E+07
E 22		14	0,5	302,14	6,112		0,367	5,58E+09
E 23		14	0,7	405,65	7,221		0,344	5,10E+09
E 24		14	0,1	288,06	8,25	monorchide	0,527	8,94E+09
E 25	20/02/2018	6	0,5	322,25	8,125		0,709	1,28E+10
E 26		6	0,7	426,456	7,321		0,521	8,82E+09
E 27		8	0,4	280,65	7,314		0,603	1,05E+10
E 28		8	0,3	371,15	6,315		0,529	8,98E+09
E 29		11	0,6	395,13	4,269		0,414	6,57E+09
E 30		11	0,5	518,6	8,365		0,581	1,01E+10
E 31		10	0,6	432,7	7,165		0,764	1,39E+10
E 32		10	0,9	225,23	5,235		0,855	1,58E+10
E 33		13	0,8	260,42	6,254		0,471	7,77E+09
E 34		13	0,4	310,52	7,654		0,53	9,01E+09
E 35	22/02/2018	5	2	201,1	4,368		0,859	1,59E+10
E 36		5	0,5	212,82	6,254		1,116	2,13E+10

E 37		12	0,3	288,65	8,216		1,274	2,46E+10
E 38		12	0,4	314,02	5,642		1,151	2,21E+10
E 39		13	0,4	465,12	6,354		1,033	1,96E+10
E 40		13	0,7	382,44	7,325		0,721	1,30E+10
E 41		13	0,1	280,33	6,145		0,858	1,59E+10
E 42		13	1	314,25	8,325		1,17	2,25E+10
E 43		12	0,7	182	6,235		1,249	2,41E+10
E 44		12	0,9	129,86	7,021		0,561	9,66E+09
E 45	**25/02/2018**	5	0,5	198,25	8,325		0,593	1,03E+10
E 46		5	0,5	285,32	9,345		0,991	1,87E+10
E 47		12	1	274,25	7,256		1,114	2,13E+10
E 48		12	0,3	299,35	4,632		0,771	1,41E+10
E 49	**27/02/2018**	8	0,6	312,78	6,215		0,706	1,27E+10
E 50		8	0,6	385,26	7,325		0,835	1,54E+10
E 51		12	0,4	342,12	8,325		0,878	1,63E+10
E 52		12	0,3	402,32	7,365		0,824	1,52E+10
E 53	**01/03/2018**	8	0,8	415,69	8,635		0,434	6,99E+09
E 54		8	0,6	485,36	6,358		0,438	7,07E+09
E 55		5	0,2	421,25	7,365	monorchide	0,701	1,26E+10
E 56		6	1	432,36	4,321	monorchide	0,649	1,15E+10
E 57		12	1	284,25	5,698		0,614	1,08E+10
E 58	**04/03/2018**	12	0,3	296,36	8,246		0,799	1,47E+10
E 59		9	0,2	275,36	4,365		0,554	9,51E+09
E 60		9	0,2	214,86	7,236		1,077	2,05E+10
E 61		13	0,2	296,36	8,365		0,816	1,50E+10
E 62	**08/03/2018**	13	1,2	275,26	6,340		0,982	1,85E+10
E 63		12	0,2	260,23	8,365		0,733	1,33E+10
E 64		12	0,1	250,33	7,325		0,656	1,17E+10

E 65		8	0,2	263,36	9,152		0,669	1,19E+10
E 66		8	0,2	256,36	8,635		0,48	7,96E+09
E 67		12	0,2	312,48	7,365		0,656	1,17E+10
E 68		12	0,1	350	6,325		0,724	1,31E+10
E 69	**11/03/2018**	12	0,1	396,36	7,325		0,766	1,40E+10
E 70		12	0,8	312,57	7,236		1,037	1,97E+10
E 71		12	1,2	300,5	5,360		0,948	1,78E+10
E 72		12	1	288,6	7,365		1,056	2,01E+10
E 73		12	0,8	217,35	6,540		1,197	2,30E+10
E 74	**13/03/2018**	12	0,4	266,36	4,365		1,1	2,10E+10
E 75		11	0,6	180,25	6,253		1,184	2,27E+10
E 76		11	0,7	199,25	8,325		1,032	1,96E+10

Tableau 04 : échantillons utilisés pour la formule correspondante à la dilution 1/1000

	D=1/1000	1	2	3	4	5	6	moyenne
E1	×	29,5	40	35,5	32,1666667	35,6666667	34,3333333	34,5277778
	concentration	**2,95E+09**	**4,00E+09**	**3,55E+09**	**3,22E+09**	**3,57E+09**	**3,43E+09**	**3,45E+09**
E2	×	36	37,1666667	34,1666667	34	38,5	35,8333333	35,9444444
	concentration	**3,60E+09**	**3,72E+09**	**3,42E+09**	**3,40E+09**	**3,85E+09**	**3,58E+09**	**3,59E+09**
E3	×	21,1666667	20,6666667	20,3333333	24,1666667	21,8333333	24	22,0277778
	concentration	**2,12E+09**	**2,07E+09**	**2,03E+09**	**2,42E+09**	**2,18E+09**	**2,40E+09**	**2,20E+09**
E4	×	36,5	36	32,5	33,1666667	33,6666667	35,1666667	34,5
	concentration	**3,65E+09**	**3,60E+09**	**3,25E+09**	**3,32E+09**	**3,37E+09**	**3,52E+09**	**3,45E+09**
E5	×	36	45	36,5	44	49	48	43,0833333
	concentration	**3,60E+09**	**4,50E+09**	**3,65E+09**	**4,40E+09**	**4,90E+09**	**4,80E+09**	**4,31E+09**
E6	×	82	88	99,2	72	82	91	85,7
	concentration	**8,20E+09**	**8,80E+09**	**9,92E+09**	**7,20E+09**	**8,20E+09**	**9,10E+09**	**8,57E+09**
E7	×		6,5	8	6	6,6	6,7	6,76
	concentration	**0,00E+00**	**6,50E+08**	**8,00E+08**	**6,00E+08**	**6,60E+08**	**6,70E+08**	**5,63E+08**
E8	**X**	82,4	84,6	82,4	82,2	83,2	83	82,9666667
	concentration	**9,89E+09**	**1,02E+10**	**9,89E+09**	**9,86E+09**	**9,98E+09**	**9,96E+09**	**9,96E+09**
E9	**X**	86,8	88	86,6	88,8	86,6	85,4	87,0333333
	concentration	**1,04E+10**	**1,06E+10**	**1,04E+10**	**1,07E+10**	**1,04E+10**	**1,02E+10**	**1,04E+10**
E10	**X**	145,6	147,8	217,6	217,4	137,6	147,8	168,966667
	concentration	**1,75E+10**	**1,77E+10**	**2,61E+10**	**2,61E+10**	**1,65E+10**	**1,77E+10**	**2,03E+10**
E11	**X**	223	224,8	224,8	221,2	224,8	224,8	223,9
	concentration	**2,68E+10**	**2,70E+10**	**2,70E+10**	**2,65E+10**	**2,70E+10**	**2,70E+10**	**2,69E+10**

Tableau 05 : échantillons utilisés pour la formule correspondante à la dilution 1/1200

	D=1/1200	1	2	3	4	5	6	moyenne
E1	×	44,5	46,8333333	15	15,8333333	16,8333333	17	26
	concentration	**5,34E+06**	**5,62E+06**	**1,80E+06**	**1,90E+06**	**2,02E+06**	**2,04E+06**	**3,12E+06**
E2	×	31	32	29	31	30,5	30,8333333	30,7222222
	concentration	**3,72E+06**	**3,84E+06**	**3,48E+06**	**3,72E+06**	**3,66E+06**	**3,70E+06**	**3,69E+06**
E3	×	14,3333333	15	13,8333333	14	12,8333333	14,8333333	14,1388889
	concentration	**1,72E+06**	**1,80E+06**	**1,66E+06**	**1,68E+06**	**1,54E+06**	**1,78E+06**	**1,70E+06**
E4	×	11,8333333	11,3333333	11,1666667	11,1666667	11	12,1666667	11,4444444
	concentration	**1,42E+06**	**1,36E+06**	**1,34E+06**	**1,34E+06**	**1,32E+06**	**1,46E+06**	**1,37E+06**
E5	×	61,3333333	68,3333333	50,6666667	53	43	55,5	55,3055556
	concentration	**7,36E+06**	**8,20E+06**	**6,08E+06**	**6,36E+06**	**5,16E+06**	**6,66E+06**	**6,64E+06**
E6	×	36,6666667	41,1666667	48,1666667	46,8333333	62,8333333	64,6666667	50,0555556
	concentration	**4,40E+06**	**4,94E+06**	**5,78E+06**	**5,62E+06**	**7,54E+06**	7760000	**6,01E+06**
E7	**×**	76,3333333	77,3333333	27,1666667	29	16,6666667	16,6666667	40,5277778
	concentration	**9,16E+06**	**9,28E+06**	**3,26E+06**	**3,48E+06**	**2,00E+06**	**2,00E+06**	**4,86E+06**
E8	X	20,8	20,8	20	19,4	18,8	18,8	19,7666667
	concentration	**2,50E+09**	**2,50E+09**	**2,40E+09**	**2,33E+09**	**2,26E+09**	**2,26E+09**	**2,37E+09**
E9	X	57	57	56,8	58,6	60,2	60,2	58,3
	concentration	**6,84E+09**	**6,84E+09**	**6,82E+09**	**7,03E+09**	**7,22E+09**	**7,22E+09**	**7,00E+09**
E10	X	37,4	37,8	55,4	54,2	46,8	48,6	46,7
	concentration	**4,49E+09**	**4,54E+09**	**6,65E+09**	**6,50E+09**	**5,62E+09**	**5,83E+09**	**5,60E+09**
E11	X	76,6	77,2	76,2	77,2	77,2	78	77,0666667
	concentration	**9,19E+09**	**9,26E+09**	**9,14E+09**	**9,26E+09**	**9,26E+09**	**9,36E+09**	**9,25E+09**

Tableau 06 : avant et après correction

dilution 1/1000

D=1000	moyenne c	DO	formule
E1	3,45E+09	0,23	eliminé
E2	3,59E+09	0,09	
E3	2,20E+09	0,11	
E4	3,45E+09	0,09	eliminé
E5	4,31E+09	0,18	
E6	8,57E+09	0,42	
E7	5,63E+08	0,12	éliminé
E8	9,96E+09	0,46	
E9	1,04E+10	0,98	eliminé
E10	2,03E+10	1,07	eliminé
E11	2,69E+10	1,16	eliminé

Echantillon	Moyenne c	DO
E1	3,59E+09	0,09
E2	2,20E+09	0,11
E3	4,31E+09	0,18
E4	8,57E+09	0,42
E5	9,96E+09	0,46

Tableau 07 : avant et après correction

dilution 1/1200

D=1200	moyenne c	DO	formule
E1	3,12E+06	0,29	
E2	3,69E+06	0,31	
E3	1,70E+06	0,16	
E4	1,37E+06	0,16	
E5	6,64E+06	0,28	éliminé
E6	6,01E+06	0,17	éliminé
E7	4,86E+06	0,17	éliminé
E8	2,37E+09	0,10	éliminé
E9	7,00E+09	0,37	éliminé
E10	5,60E+09	0,34	
E11	9,25E+09	0,53	

Echantillon	Moyenne c	DO
E1	3,12E+06	0,29
E2	3,69E+06	0,31
E3	1,70E+06	0,16
E4	1,37E+06	0,16
E5	5,60E+09	0,34
E6	9,25E+09	0,53

Tableaux 08 : test de Fisher

Prédiction		Les résidus		(Les résidus) ²	
Ŷ1	Ŷ2	Rs1	Rs2	$Rs1^2$	$Rs2^2$
2,248686	3,879888	1,35	-0,76	1,81	0,58
2,521314	4,405088	-0,32	-0,72	0,10	0,52
4,225239	1,211872	0,08	0,48	0,01	0,24
9,700518	1,190864	-1,13	0,18	1,28	0,03
10,450245	5,098352	-0,49	0,51	0,24	0,26
26,353545	8,942816	0,51	0,31	0,26	0,09

SCR1	3,71
CR2	1,71

Moy résidus 1	0,62
Moy résidus 2	0,29

Résumé :

L'objectif du présent travail a été d'estimer la concentration du sperme épididymaire équin par l'élaboration d'une formule qui permet de déduire cette concentration à partir de la densité optique de l'échantillon. Pour cela 72 testicules de chevaux Barbe ont été récupéré de l'abattoir EL HARRACH (Alger), et le sperme a été collecté par la méthode du flush rétrograde.

Le sperme collecté a été dilué à 1:1200 (v/v) avec du Na Cl formolé. Pour la mesure de la concentration à l'aide de l'hématimètre de Malassez, 12 échantillons ont été analysé à fin d'obtenir la formule puis le reste a été mesuré par spectrophotométrie (à λ = 500 nm). La méthode hématimètrique qui représente la méthode de référence par excellence, et la méthode spectrophotométrique a révélé que cette dernière représente une alternative (puisque les résultats des 2 méthodes sont très corrélés avec r = 0.97 **et 0.99** pour les dilutions **1 :1000** et **1 :1200** respectivement) plus rapide et plus sensible grâce à sa capacité à détecter des variations minimes de concentration.

Résultats : après correction des aberrations on a obtenu une courbe linière dont l'équation Y1=ax1+b (=22,719x + 0,1131) et Y2=ax2+b (=21,008x - 2,1284) correspondant aux dilutions 1/1000 et 1/1200 respectivement et qui permet de prédire les concentrations (y) à partir des absorbances (x)

Mots clés : étalon ; concentration ; épididyme ; spectrophotomètre ; cellule de malassez ;

Abstract :

The objective of the present work was to estimate the equin epididymal sperm concentration by the elaboration of a formula which makes it possible to deduce this concentration from the optical density of the sample. For this 72 testes of Barbe horses were recovered from the slaughterhouse EL HARRACH (Algiers) and the semen was collected by the retrograde flush method.

The collected sperm was diluted 1: 1200 (v / v) with formaldehyde Na Cl. For the measurement of the concentration using the Malassez hematimeter, 12 samples were analysed to obtain the formula and the rest was measured by spectrophotometry (at λ = 500 nm). the hematimetric method which represents the golden standard method and the spectrophotometric method revealed that the latter represents an alternative (since the results of the two methods are highly correlated with **r = 0.97** and 0.99 for the dilutions **1: 1000** and **1: 1200** respectively) faster and more sensitive thanks to its ability to detect minimal variations in concentration.

Results : after correction of the aberrations a linear curve was obtained whose equation Y1 = ax1 + b (= 22,719x + 0,1131) and Y2 = ax2 + b (= 21,008x - 2,1284) corresponding to the dilutions 1/1000 and 1/1200 respectively and which makes it possible to predict the concentrations (y) from the absorbances (x)

Key words : stallion ; concentration ; epididymis ; spectrophotometre ; malassez's cel

ملخص:

كان الهدف من هذه الدراسة تقدير تركيز الحيوانات المنوية بربخي الخيول من خلال تطوير صيغة للاستدلال على هذا التركيز من الكثافة ضوئية للعينة. بالنسبة لهذا 72 خصية للخيول تم احضارها من مذبح الحراش (الجزائر) وتم جمع السائل المنوي بواسطة طريقة التدوير الوراء.

تم تخفيف الحيوانات المنوية التي تم جمعها 1: 1200 (ت / ت) مع كلوريد الصوديوم الفورمالديهايد. لقياس تركيز باستخدام خلية مالاسيز، 12 عينة درست للحصول على الصيغة باستعمال خلية مالاساز ، ثم تم قياس بقية العينات بضوء الطيف (في λ = 500 نانومتر).

طريقة الحساب بخلية مالاساز تمثل طريقة مرجعية بامتياز وبالرغم من ذلك تم كشف أن طريقة القياس بضوء الطيف تمثل البديل (منذ اعلان ان نتائج الطريقتين ترتبط إلى حد كبير مع ص = 0.97 و 0.99 الموافقة للتخفيفات 1: 1000 و 1: 1200 على التوالي) أسرع وأكثر حساسية بفضل قدرته على الكشف عن الحد الأدنى من الاختلافات في التركيز.

النتائج: بعد تصحيح الانحرافات تم الحصول على منحنى خطي معادلا Y1 = ax1 + b (= 22,719x + 0,1131) and Y2 = ax2 + b (= 21,008x - 2,1284) المقابلة للتخفيفات 1: 1000 و 1: 1200 على التوالي ، و التي تمكننا من التنبأ بالتركيزات (y)من الامتصاص (x).

الكلمات المفتاحية: حصان, التركيز ,الربخي, جهاز الطيف الضوئي, خلية مالاساز.