

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

ECOLE NATIONALE SUPERIEURE VETERINAIRE – ALGER
المدرسة الوطنية العليا للبيطرة - الجزائر

PROJET DE FIN D'ETUDES
EN VUE DE L'OBTENTION
DU DIPLOME DE DOCTEUR VETERINAIRE

**Utilisation du spectrophotomètre pour la
détermination de la concentration spermatique pour
l'espèce Dinde.**

Présenté par : DABOUZ OUARDIA
BOUHLA SOUMIA
BACHI SOUHILA

Soutenu le : 27 juin 2012

Le jury :

Présidente : Mm. TEMIM S (Professeur à l'ENSV)
Promoteur : MR BOUDJELLABA S, (Maître Assistant à l'ENSV)
Examineur : Mm ILES (Maître Assistant à l'ENSV)
Examineur : Mm SAIDJ D (Maître Assistant à l'ENSV)

Année universitaire : 2011/2012

Remerciements

Nous souhaitons manifester nos sincères remerciements à :

DIEU le Tout Puissant qui nous avoir donné, la force et la patience ainsi que le courage pour aller jusqu'au bout de ce travail.

On exprime d'abord notre profond remerciement et notre vive reconnaissance à notre encadreur Mr BOUDJELLABA SOFIANE. Maitre assistant à L'ENSV pour nous avoir accepter, aider, orienter et encourager durant ce travail et de nous avoir montrés le bon chemin grâce à ses remarques mais surtout à ses grandes compétences.

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

-Madame .TEMIM S, Professeur à L'ENSV

-Mme. ILËS.I maitre assistant à l'ENSV

-Mme. SAIDJ maitre assistant à l'ENSV

Et A l'ensemble de la famille enseignante de l'ENSV pour nous avoir formés durant toutes ces années.

Nous tenons aussi à remercier les employés de la bibliothèque et surtout MR, YACINE.

Nos sentiments de reconnaissance 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 modeste travail.

Nous n'oublierons jamais 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

À mes très chers parents à qui je dois toutes mes études, que Dieu me les garde.

À mon grand-père MOUHAMED et ma grand-mère à qui je souhaite longue vie.

À mes frères Aziz, IDIR et surtout mon chère ABD Allah.

À tous mes proches, oncles et tentes, et leurs familles.

À mes collègues de travail : SOUMIA et SOUHILA.

À mes amis, je cite en particulier. FATIMA, ASSIA,

Ainsi à toute la promotion 2007 de L'ENSV

OUARDIA

Dédicace

Au nom de dieu le tout puissant et le très miséricordieux par la grâce duquel j'ai pu réaliser ce travail que je dédie à :

Mes parents,

*Parce que sans vous je ne serais pas là,
Pour tout votre amour et votre soutien, si précieux, pendant toutes ces années,
et encore aujourd'hui, et encore demain.....*

Comment vous dire merci...

*Avec tout mon amour, et toute ma reconnaissance,
Dieu vous protège.*

*Mes sœurs adorées : Faiza, Nadia, Nacéra, Mes frères : Ismail, Amine,
Mes neveux : Kholoud et Marya*

*Parce c'est avec vous que je me sens complète,
parce que vous me faites rire, parce que je peux tout vous dire,
pour ces millions de souvenirs où vous êtes là, toujours présentes à mes côtés,
et pour ceux à venir. Je serai toujours là pour vous !*

Ne partez pas trop loin de moi.

Je ne vous le dis pas assez, je vous aime mes sœurs, mes frères !

Toute ma grande famille : BOUHLA

Mes collègues : Ourdia et Souhila

Ma chère amie : Lila LOUEJDI

Mes amis et à tous ceux que je connais et que j'aime

Soumia

Dédicace

Je dédis ce modeste travail d'abord à mes parents qui m'ont avoïr aider

dans toute ma vie et que dieux me les protège

À mes belles sœurs : Hanna, Amina et ma petite Manel

À mon seul et aimable frère Mohamed que je lui souhaite la réussite à

l'examen du BAC

À mes grands parents : Aicha, Hdjila et Simen que dieux me les

garde

À mes deux collègues qui m'ont partagé le travail : Soumia et

Wardia

À mes amies adorables : Assia, Hanna, Nada, Lisa,

À tout mes amies de l'école sans exception que j'ai passée avec eux de

très bons moments

À toute personne qui m'a aidé financièrement ou moralement

Souhila

Introduction	1
Partie bibliographique :	
CHAPITRE I : le spectrophotomètre	
I.1. Historique	2
I.2. Domaine spectral UV-Vis.....	2
I.3.Appareils et méthodes.....	3
I.3.1.Définition de spectrophotomètre.....	4
I.3.2. Analyse quantitative : la loi d'absorption moléculaire	4
I.3.2.1. La loi de beer et Lambert	4
I.3.2.2. Propriétés et limites de la validité de la loi de beer-Lambert.....	5
I.3.2.2.1 Monochromatisme du faisceau incident.....	6
I.3.2.2.2. concentration	6
I.3.2.2.3. Influence de milieu	6
I.3.3. Instrumentation dans l'UV-Vis.....	7
I.3.3.1. Principe et fonctionnement d'un spectrophotomètre.....	7
I.3.3.2. Description des éléments de base d'un spectrophotomètre.....	8
I.3.3.2.1. Source lumineuse	8
I.3.3.2.2. Sélecteur de longueur d'onde	8
I.3.3.2.3. Système de détection	9
I.3.4. Cellules (cuves).....	10
I.3.5. Configurations des spectrophotomètres.....	11
I.4. Utilisation en biologie, biochimie, médecine et pharmacie.....	13
I.5. Avantages d'un spectrophotomètre.....	14
I.6. Inconvénients d'un spectrophotomètre.....	14

I.7. Limites d'un spectrophotomètre	15
---	----

CHPITR II : la lame de malassez

II.1. définition et but.....	17
II.2. matériels hématimétrique.....	17
II.3.les cellules hématimétrique les plus utilisées.....	18
II.4. description des cellules hématimètres.....	19
II.5.caractérisation de la chambre de la lame de malassez.....	19
II.6. mode opératoire.....	20
II.7. principe de comptage.....	21
II.7.1. Procédure :	23
II.7.2. calcul de la concentration	23
II.8. Limitations de l'examen	25

CHAPITRE III : l'étalonnage de sperme

III.1. Définition de l'étalonnage.....	26
III .2. Objectif de l'étalonnage.....	26
III.3. Principe de l'étalonnage.....	27
III.4.Réalisation de la courbe de l'étalonnage.....	28
III.5. Présentation de la courbe de l'étalonnage.....	30
III.5.1. Transmittance par rapport à la concentration sur papier métrique	30
III.5.2. Logarithme de le transmittance par rapport à la concentration sur papier métrique.....	30
III.5.3. Logarithme de le transmittance par rapport à la concentration sur papier semi logarithme..	30
III.5.4. Densité optique par rapport à la concentration	31
III.6. Méthodes de calculs des résultats	32
III.6.1. Courbe préfabriquée	32

III.6.2. Courbe de calibration personnelle.....	32
III.7. Les modalités de l'étalonnage	32
III.7.1. Méthodes de l'étalonnage externe	32
III.7.2. Méthodes de l'étalonnage interne	33
III.7.3. Méthodes des ajouts	33
III.8. les différents types d'étalon	34
III.8.1. Etalon primaire ou solution standard.....	34
III.8.2. Etalon secondaire.....	34
III.9. L'incertitude de l'étalonnage	35

Partie expérimentale :

CHAPITRE I : matériels et méthodes

I.1. Echantillons	37
I.2. Mesure par spectrophotomètre :.....	37
I.2.1. Matériels :.....	37
I.2.2. Méthode de dosage :.....	37
I.3. Comptage à la malassez.....	38
I.3.1. Matériels :.....	38
I.3.2. Méthode de comptage :.....	38

CHAPITRE II : la courbe d'étalonnage

II.1. Courbe d'étalonnage du spectrophotomètre pour la détermination de la concentration de la semence de dindes.....	39
II.2. Etalonnage du spectrophotomètre pour la semence des dindons en fonction de l'âge	41
II.2.1. Courbe d'étalonnage du spectrophotomètre pour la semence des dindons de 28 semaines d'âge.....	41
II.2.2. Courbe d'étalonnage du spectrophotomètre pour la semence des dindons de 56 semaines d'âge	42
II.3. Correction de la courbe d'étalonnage.....	43
II.3.1. Courbe d'étalonnage du spectrophotomètre pour la semence des dindons de 28 semaines d'âge après correction.....	43
II.3.2. Courbe d'étalonnage du spectrophotomètre pour la semence des dindons de 56 semaines d'âge après correction.....	44
II.3.3. Courbe d'étalonnage du spectrophotomètre pour la semence des dindons de 28 et 56 semaines d'âge après correction.....	45
II.4. Choix de la formule.....	46
Conclusion.....	47

Liste des tableaux

Tableau n°01 : tableau comparatif des différentes hématimètres.....	19
--	----

Liste des figures :

Figure n° 01: spectre des rayonnements électronique

Figure n° 02 : Décomposition de la lumière par un prisme

Figure n° 03 : Représentation du principe de la loi Beer-Lambert

Figure n° 04 : Schéma représentant le principe du fonctionnement du spectrophotomètre

Figure n° 05 : monochromateur à prisme

Figure n° 06 : Monochromateur à réseau

Figure n° 07 : spectrophotomètre conventionnel

Figure n° 08 : Spectrophotomètre à barrette de diodes

Figure n° 09 : schéma représentatif d'un spectrophotomètre mono-faisceau

Figure n° 10 : spectrophotomètre à double faisceaux

Figure n° 11 à gauche : photo réelle représentant la lame de malassez

Figure n° 12 à droite : schéma représentant la lame de malassez avec une lamelle

Figure n° 13 : représentation du quadrillage de la lame de Malassez

Figure n° 14 : à gauche: schéma représentatif le dépôt de la lamelle sur la lame de malassez

Figure n° 15 : à droit : photo réelle représentatif le dépôt de la lamelle sur la lame de malassez

Figure n° 16 : photo réelle représentant le dépôt de l'échantillon par la pipette

Figure n° 17 : schéma représentatif le dénombrement par rectangle

Figure n° 18 : schémas représentant le choix des rectangles dans le dénombrement

Figure n° 19 : représentation de la courbe théorique d'étalonnage

Figure n° 20 : succession des échantillons de concentrations connues, puis inconnue

Figure n° 21 : représentation de la courbe d'étalonnage : Transmittance par rapport à la concentration sur papier métrique

Figure n° 22 : représentation de la courbe d'étalonnage : Logarithme de la transmittance par rapport à la concentration sur papier métrique

Figure n° 23 : représentation de la courbe d'étalonnage : transmittance par rapport à la concentration sur papier semi-logarithme

Figure n° 24 : représentation de la courbe d'étalonnage : Densité optique par rapport à la concentration

Figure n° 25 : courbe d'étalonnage par méthode de l'étalonnage externe

Figure n° 26 : courbe d'étalonnage par méthode des ajouts

Figure n° 27 : Exemple de droite et courbe d'étalonnage avec les incertitudes associées (pour la courbe)

Figure n° 28 : courbe de corrélation représentant l'étalonnage du spectrophotomètre pour le calcul de la concentration de la semence Dinde

Figure n° 29 : courbe de corrélation représentant l'étalonnage du spectrophotomètre pour le calcul de la concentration de la semence des dindons de 28 semaines d'âge

Figure n° 30 : courbe de corrélation représentant l'étalonnage du spectrophotomètre pour le calcul de la concentration de la semence des dindons de 56 semaines d'âge

Figure n° 31 : courbe de corrélation représentant l'étalonnage du spectrophotomètre pour le calcul de la concentration de la semence des dindons de 28 semaines d'âge après correction.

Figure n° 32 : courbe de corrélation représentant l'étalonnage du spectrophotomètre pour le calcul de la concentration de la semence des dindons de 56 semaines d'âge après correction

Figure n°33 : courbe de corrélation représentant l'étalonnage du spectrophotomètre pour le calcul de la concentration de la semence Dinde après enlèvement des aberrations statistiques en fonction de l'âge et après une deuxième correction

Introduction

Parmi les nombreuses méthodes instrumentales utilisées pour déterminer la concentration d'une espèce chimique en solution, les méthodes les plus courantes sont celles basées sur la mesure de l'intensité d'absorption ou d'émission (spectrophotométrie) d'un rayonnement électromagnétique par les espèces à doser. Les rayonnements les plus souvent utilisés sont l'ultraviolet (UV), la lumière visible et l'infrarouge (IR). Le domaine du visible et de l'UV a été abondamment étudié et ce depuis longtemps. Mais s'il est indispensable pour une approche expérimentale de la nature de la liaison chimique, il est pauvre en information structurale. Son emploi est de plus en plus réservé à l'analyse quantitative via la loi de Beer-Lambert. Ainsi Le spectrophotomètre est devenu un appareil couramment utilisé dans tous laboratoire biochimique et autre, qui conduit à des mesures d'absorbances précises de concentration d'une substance donnée où cette dernière est peut être appréciée par la lame de malassez.

Un spectrophotomètre est conçu autour de trois modules :
Ceux de la source lumineuse, du système dispersif et celui qui est responsable de la détection

L'absorption de la lumière a pour origine l'interaction des photons de la source lumineuse avec les électrons des liaisons des espèces présentes dans l'échantillon observé, généralement constitué de molécules.

Notre travail s'inscrit dans celle même optique c'est-à-dire d'évaluer la concentration spermatique par spectrophotomètre. Cette opération nécessite au préalable un étalonnage de cet appareil pour l'adapter à la concentration spermatique de l'espèce dinde et d'essayer de déterminer le degré d'erreur par rapport au comptage par une cellule Malassez.

L'absorbance de la semence est mesurée par le spectrophotomètre. Puis la concentration de chaque échantillon est évaluée par la cellule de malassez et en fin on trace une courbe de corrélation entre les absorbances et les concentrations, c'est la courbe d'étalonnage en notant l'absorbance en abscisse et la concentration en ordonné.

Partie bibliographique

Chapitre I

Le spectrophotomètre

Chapitre I : le spectrophotomètre

I. Historique

L'UV/Visible est largement exploité en analyse quantitative, depuis fort longtemps dans le domaine du visible. Les mesures reposent sur la loi de Beer et Lambert qui relie dans certaines conditions, l'absorption de la lumière à la concentration d'un composé en solution (ROUESSAC .A et ROUESSAC.F, 2009)

Bouguer a trouvé en 1729, que des épaisseurs égales de matière absorbent des quantités proportionnelles (et non pas égales) de lumière et publiée dans son ouvrage *Essai d'Optique sur la Gradation de la Lumière* (Claude Jombert, Paris, 1729). Le physicien et l'astronome allemand *J LAMBERT* qui connaissait les travaux de Bouguer a donné en 1760 une formulation mathématique plus exacte des observations de ce dernier. Ce n'est qu'en 1852 que *A. Beer*, professeur de mathématique à Bonn, a trouvé la bonne formulation (BURGOT .G et BURGOT.A, 2006). La loi de Beer-Lambert, aussi connue comme la loi de Beer-Lambert-Bouguer et chez les francophones parfois même simplement comme la loi de Bouguer, est une relation empirique reliant l'absorption de la lumière aux propriétés des milieux dans lesquels elle passe. La loi de Beer-Lambert établit une proportionnalité entre la concentration d'une entité chimique en solution, l'absorbance de celle-ci et la longueur du trajet parcouru par la lumière dans la solution (MCNAUGHT et WILKINSON, 1997).

I. 2. Le domaine spectral UV-visible

Ce domaine spectral est divisé en trois plages appelés proche UV (185-400), visible (400-700) et très proche infrarouge (700-1100). La limite inférieure dépend à la fois de la nature des matériaux optiques utilisés et de la présence ou non sur le trajet lumineux de dioxygène et de vapeur d'eau dans l'air (ALBERT J, 2001).

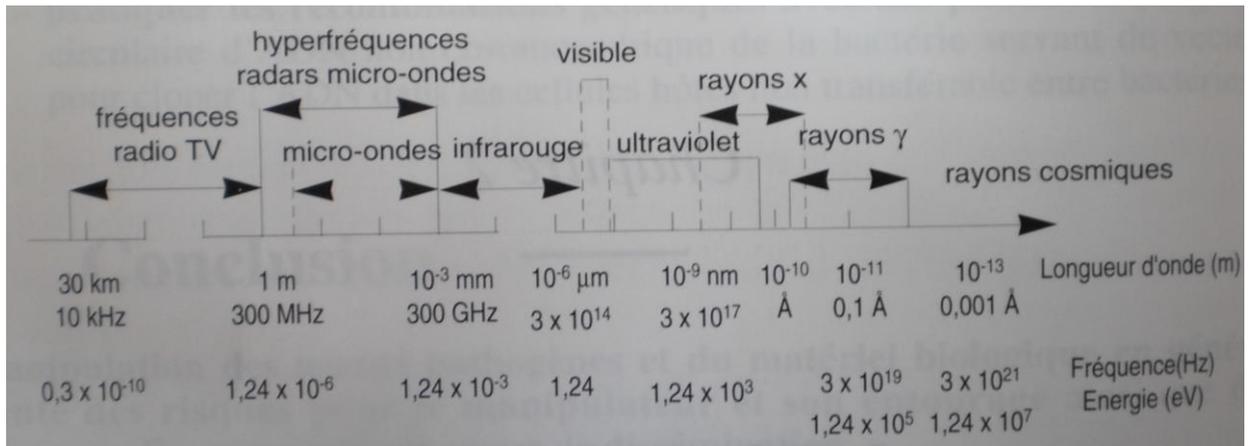


Figure n°1 : spectre des rayonnements électroniques (Picot .A. et Grenouillet. P)

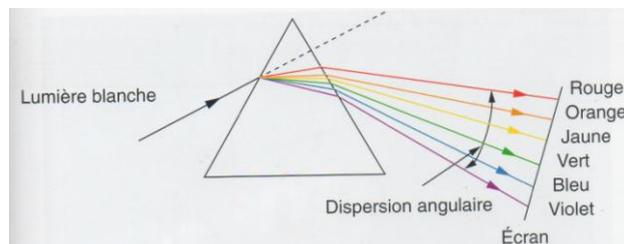
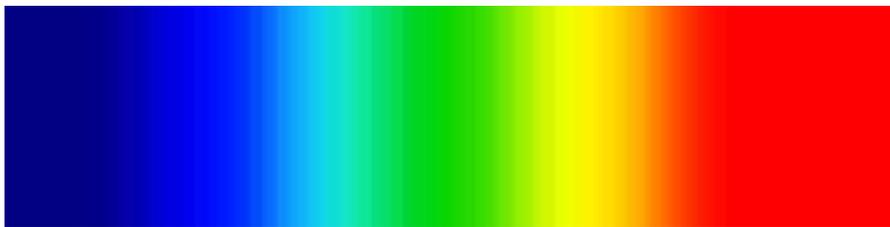


Figure n°2 : Décomposition de la lumière par un prisme (HAINQUE B .BAUDIN B et LEFEBVRE Ph, 2008)

I.3. Appareils et méthodes

I.3.1. Définition du spectrophotomètre

Un spectrophotomètre est l'un des instruments scientifiques qu'on trouve couramment dans de nombreuses recherches et les laboratoires industriels. Les spectrophotomètres sont utilisés pour la recherche en physique, biologie, biologie moléculaire, chimie et biochimie ... Typiquement, le nom du spectrophotomètre se réfère au spectre de la longueur d'onde de la lumière soit dans le domaine de l'ultraviolet ou du visible (UV-Vis spectroscopie).

L'énergie de la lumière dépend de sa longueur d'onde, généralement désignée comme λ . Bien que le spectre électromagnétique s'étende sur une très large gamme de longueurs d'onde, la plupart des laboratoires ne peuvent mesurer qu'une petite fraction d'entre eux. On peut trouver différents dérivés et domaines d'utilisation du mot « spectrophotomètre » :

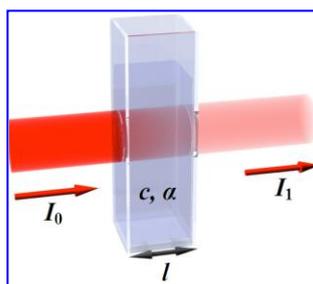
- **Spectrométrie** : Mesure de grandeurs physiques associées à un spectre. *Spectrométrie des rayons X. La spectrométrie d'absorption utilise la propriété d'une substance d'absorber un rayonnement à une longueur d'onde qui lui est propre (Encyclop. Sc. Techn.t, 1973).* date de dernière consultation 18.06.2012.
- **Spectrophotomètre** : Appareil permettant de tracer les spectres d'émission des sources lumineuses, à l'aide d'une cellule photo-électrique `` (NEYRON, 1970). *Spectre d'absorption (...) tracé automatiquement par un spectrophotomètre enregistreur (PRIVAS DE GARILHE, 1963).*
- **Spectrophotométrie** : Détermination précise de l'intensité des diverses bandes d'un spectre d'absorption et de leur position (*Méd. Biol,1972*). *Les métaux alcalins se dosent commodément par spectrophotométrie de flamme (DUVAL Cl, 1966).*

I.3.2. analyse quantitative: la loi d'absorption moléculaire

I.3.2.1.Loi de Beer et Lambert

Supposons qu'un faisceau de lumière monochromatique une épaisseur l de la solution d'un corps absorbant. Soient I_0 l'intensité du faisceau lumineux à l'entrée de la solution et I son intensité à la sortie (figure n°3) ; soit c la concentration du corps absorbant. La loi de Lambert et celle de Beer peuvent s'exprimer en une relation unique :

$$A_\lambda = \varepsilon_\lambda l c$$



Diminution de l'intensité d'un faisceau lumineux ($I_1 < I_0$) traversant un milieu d'épaisseur l avec une constante d'absorption α et une concentration d'absorbants c .

Figure n° 3: Représentation du principe de la loi Beer-Lambert (wikimedia – english) date de dernière consultation 19.06.2012.

- la « transmission » T est définie comme étant le rapport des deux intensités lumineuses I/I_0 ; on l'exprime souvent en pour cent.
- l'absorbance (densité optique) A (ou extinction E) est le logarithme du rapport inverse : $A = \log I_0/I$ (CHARLOT.G,1978). c'est un paramètre optique sans dimension, accessible au moyen du spectrophotomètre
- l : est l'épaisseur (en cm) de la solution traversée
 - c : la concentration molaire,
 - ε_λ : le coefficient d'absorption molaire ($L. mol^{-1} .cm^{-1}$) à la longueur d'onde λ à laquelle on fait la mesure. Ce coefficient (également appelé coefficient d'absorbance) propre au composé analysé, dépend en outre de la température et du solvant. Généralement sa valeur est répétée pour la seule longueur d'onde du maximum d'absorption. Elle peut varier sur une large plage allant de quelques unités à plus de 200 000.

En appelant I_0 l'intensité lumineuse de la radiation incidente en amont du milieu traversé d'épaisseur l . La loi de Beer et Lambert, considérée à l'origine comme un postulat, a fait l'objet par la suite de nombreuses interprétations et démonstrations en partant d'hypothèses statiques, cinétiques ou simplement logiques. Cette loi, qui ne concerne que la fraction de la lumière absorbée, n'est vérifiée que si l'ensemble des conditions suivantes est respecté : (ROUESSAC .F et ROUESSAC. A ,2009)

I.3.2.2. Propriétés et limites de validité de la loi de Beer-Lambert

Toute molécule biochimique incluant des électrons, c'est-à-dire au moins une double liaison, absorbe dans le proche ultraviolet entre 200 nm et 400 nm. La loi de Beer-Lambert s'applique à cette absorption aux mêmes conditions et restrictions que dans la zone visible du spectre (SERGE B, 1985) ; en effet, la loi de Beer est une loi qui exige des conditions idéales aussi bien pour le faisceau, qui doit être monochromatique, que pour la solution, dans laquelle on suppose l'absence de toute action étrangère au faisceau lumineux sur le corps absorbant (CHARLOT .G ,1978).

- La lumière utilisée doit être monochromatique ;
- Les concentrations doivent être faibles ;
- La solution ne doit être ni fluorescente ni hétérogène ;
- Le soluté ne doit pas donner lieu à des transformations photochimiques ;
- Le soluté ne doit pas donner d'associations variables avec le solvant ;

I.3.2.2.1. Monochromatisme du faisceau incident

Dans la pratique, le monochromatisme parfait n'existe pas. Un monochromateur isole, à partir d'une source continue, une bande de radiations aussi étroite que possible (quelques 1/10 de nm à quelques nm) et appelée bande passante.

La mesure d'une densité optique sera plus aisée au voisinage d'un maximum d'absorption (pic d'absorption). Il sera donc plus facile de mesurer une densité optique lorsque l'absorption ne variera pas trop rapidement avec la longueur d'onde ; en particulier, l'existence, en infrarouge de pics d'absorption étroits, rendra difficile la mesure de densité optique dans ce domaine de longueurs d'ondes (AUDIGIE Cl et al, 1995). En effet, une bande passante de lumière incidente trop large (lumière insuffisamment monochromatique) entraîne une imprécision sur la valeur du coefficient d'absorption qui se traduit par un écart à la linéarité (BURGOT.G et BURGOT.J, 2006).

I.3.2.2.2. Concentration

Il faut savoir que le coefficient d'extinction, ϵ est fonction de l'indice de fraction n . or cet indice dépend de la concentration. Donc, La loi de Beer-Lambert est une loi limite, puisque le coefficient ϵ ne devint constant qu'aux dilutions infinies. Seules les solutions très diluées, donc suivent la loi. Lors d'une mise au point de dosage, il est nécessaire de connaître le domaine de linéarité de la fonction $DO = f(C)$, appelée fonction d'étalonnage (AUDIGIE Cl et al, 1995). Effectivement, aux concentrations élevées, les molécules interagissent entre elles ce qui modifie la distribution de leur charge et leur capacité à absorber la lumière. Certaines peuvent former des dimères responsables de modifications du coefficient d'absorption molaire. Par exemple, le bleu de méthylène voit son coefficient d'absorption molaire augmenter de 88 % à 436 nm quand sa concentration passe de 10^{-6} à 10^{-2} mol.l⁻¹. Pour éviter ce phénomène, il est nécessaire d'utiliser des solutions de concentrations inférieures à 10^{-2} mol.l⁻¹. Elles doivent être préparées dans des milieux de forces ioniques faibles (BURGOT .G et BURGOT.J, 2006).

I.3.2.2.3. Influence du milieu

Dans un milieu trouble (solution colloïdale, suspension...), une partie de l'énergie lumineuse est absorbée, mais une autre partie est diffusée et échappe ainsi à la mesure. Dans un milieu fluorescent, une partie de la lumière est réémise dans toutes les directions (AUDIGIE Cl et al, 1995) La spectrophotométrie UV/visible est réservée à l'étude des solutions limpides, l'étude des suspensions est réalisée par une turbidimétrie (BURGOT .G et BURGOT .G, 2006).

Si ϵ , en principe, ne dépend pas du solvant, en fait, on constate expérimentalement des variations dues aux modifications des forces intermoléculaires. De même, des concentrations

importantes de sels incolores peuvent modifier les relations entre densité optique et concentration (AUDIGIE Cl et al, 1995).

I.3.3. Instrumentation dans l'UV/Visible

Les premiers spectrophotomètres dans le visible et l'ultraviolet utilisaient respectivement l'œil et les plaques photoélectriques, mais ils sont aujourd'hui presque tous photoélectriques (BROWNING D, 1974).

I.3.3.1.Principe du fonctionnement d'un spectrophotomètre

Un spectrophotomètre est conçu autour de trois modules : Ceux de **la source** et du **système dispersif** (souvent conçu comme un monochromateur), qui constituent la partie optique et celui qui est responsable de la **détection**. L'ensemble est réuni dans un bâti unique. Un compartiment échantillon est inséré sur le trajet optique après et avant le système dispersif selon la conception du montage.

Une source de lumière blanche traverse un monochromateur qui sélectionne une radiation de longueur d'onde λ . Le faisceau de lumière monochromatique traverse alors une solution colorée. Un photodétecteur convertit l'intensité lumineuse transmise en un signal électrique. Enfin un analyseur traite le signal électrique et affiche la valeur de l'absorbance.

Certains spectromètres sont réservés aux analyses de routine pour lesquelles, il n'est besoin d'avoir une résolution élevée, sachant qu'en solution la plupart des composés conduisent à des spectres dépourvus de bandes. Il est essentiel, en revanche, que ces instruments conduisent à des mesures d'absorbances précises sur une gamme étendue de concentrations (ROUESSAC .F et ROUESSAC.A, 2009)

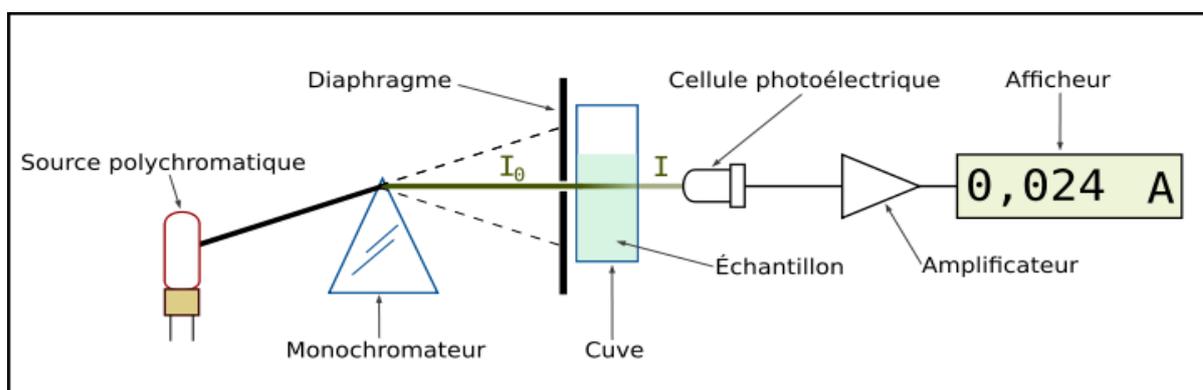


Figure n°4 : Schéma représentant le principe du fonctionnement du spectrophotomètre.

(fr.wikipedia.org date de dernière consultation 20.06.2012)

I.3.3.2. Description des éléments de base d'un spectrophotomètre

I.3.3.2.1. Source lumineuse

On ne connaît pas de source lumineuse continue pouvant couvrir efficacement la totalité de la gamme spectrale concernée. C'est la raison pour laquelle beaucoup de spectromètres comportent deux lampes à usage de sources, l'une pour la partie proche UV et l'autre pour la partie s'étendant vers le visible (ROUESSAC .F et ROUESSAC .A ,2009).

Les lampes produisent un rayonnement lumineux de spectre continu qui est filtré par un monochromateur. Les photons sont obtenus par décharge électrique dans un gaz. On utilise en général deux lampes :

- **Une lampe à filament de tungstène** dont les longueurs d'onde d'émission λ sont comprises entre 350 et 2500 nm elles sont utilisées dans le domaine du visible et du proche IR.
- **une lampe à hydrogène ou au deutérium** qui émet des rayonnements de longueurs d'onde λ comprises entre 160 et 375 nm c'est-à-dire dans le domaine de l'ultraviolet (BURGOT .G et BURGOT.J, 2006).

Toute source lumineuse doit évidemment fonctionner sur alimentation électrique stabilisée (SERGE B ,1985).

I.3.3.2.2. Sélecteur de longueur d'onde.

Pour obtenir un rayonnement monochromatique, il est nécessaire de décomposer la lumière polychromatique fournie par la lampe en ses différents constituants et de sélectionner une bande spectrale très étroite de longueurs d'onde données.

Le monochromateur, système qui équipe les spectrophotomètres et qui permet de sélectionner toutes les longueurs d'onde du spectre (BURGOT.G et BURGOT.A, 2006).

Un monochromateur est constitué :

_d'une fente d'entrée ;

_d'un système de dispersion qui permet de décomposer la lumière blanche en ses différentes composantes. Il s'agit de prismes ou de réseaux concaves ou holographiques. Ces derniers, d'apparition plus récente, sont obtenus grâce à une nouvelle technologie laser et fournissent des spectres contenant moins de lumière parasite ;

_d'une fente de sortie pour sélectionner la longueur d'onde.

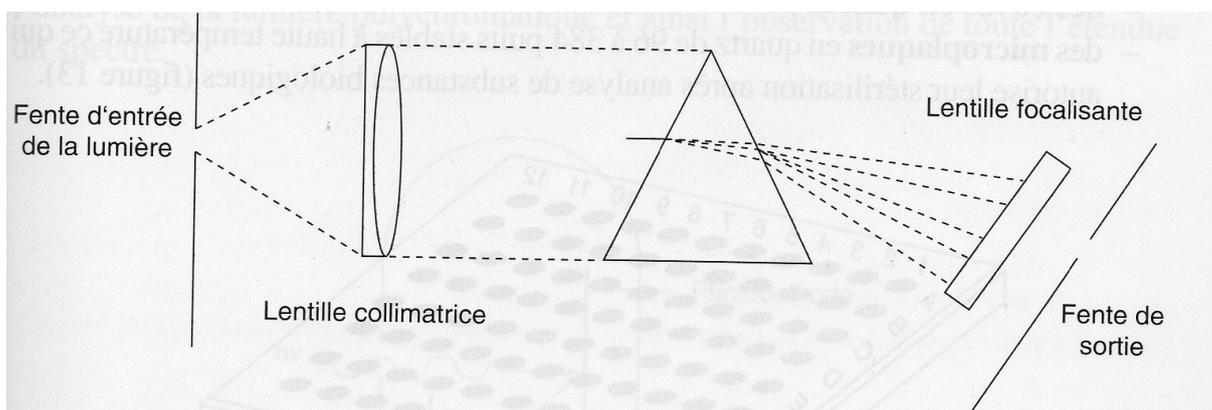


Figure n°5 : monochromateur à prisme (BURGOT.G et BURGOT.A, 2006).

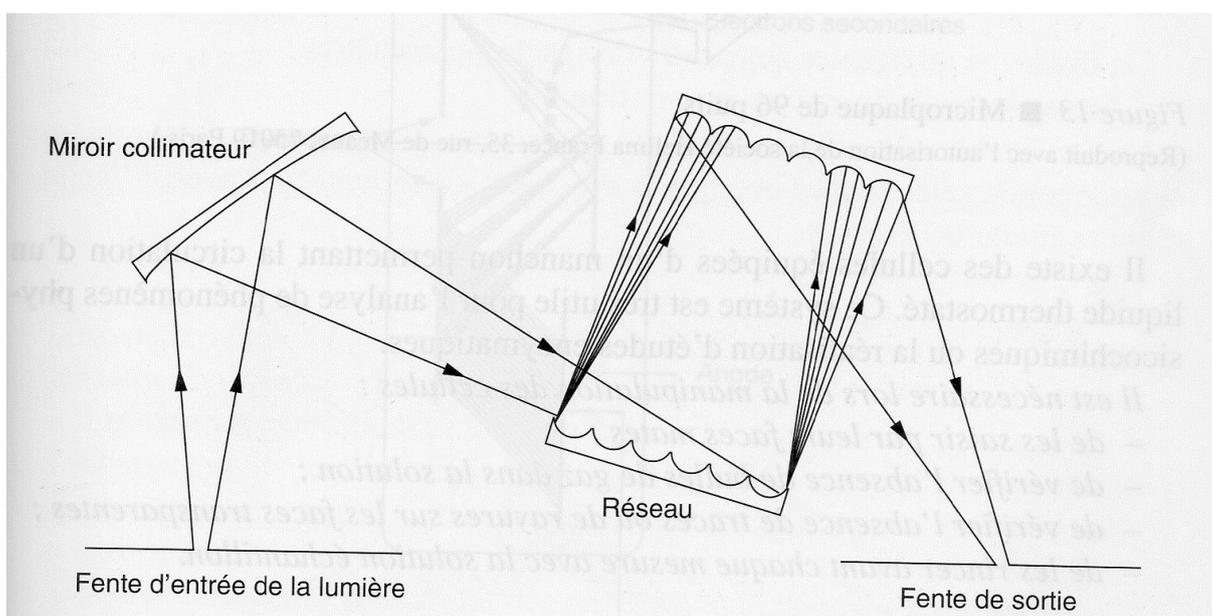


Figure n ° 6: Monochromateur à réseau (BURGOT.G et BURGOT.A, 2006)

La bande passante d'un monochromateur varie de 1 à 20 nm. Une fente étroite diminue la puissance du rayonnement lumineux et nécessite un système de détection plus performant muni d'une forte amplification.

Selon les exigences de la pharmacopée européenne, les analyses de contrôle de matières premières et de préparations pharmaceutiques doivent être réalisées avec un monochromateur à réseau de bande passante ≤ 2 nm (BURGOT.G et BURGOT.A, 2006)

I.3.3.2.3. Systèmes de détection

Dans tous les photomètres modernes, le flux lumineux émergent de la cuve est transformé en un flux électronique d'intensité proportionnelle, facile à amplifier et à mesurer. Une cellule photoémissive où PHOTOTUBE inclut deux électrodes enfermées sous vide dans une enveloppe de verre : a) anode collectrice dans l'axe du tube b) cathode

émisive enveloppant l'anode. Le signal initial est presque toujours amplifié par des électrodes multiples (dynodes) ; entre chacune d'elles s'établit une différence de potentiel accélératrice, d'où nouvelle émission d'électrons et nouvel effet amplificateur après chaque passage : tel est le principe PHOTOMULTIPLICATEUR qui peut fournir des amplifications jusqu'à 10^6 – tout système détecteur doit être situé très près de la cuve pour éviter la déperdition d'énergie.

Le signal émergent de détection peut être repris par un circuit électronique amplificateur (des valeurs atteignant 10^{10} au total permettent de mesurer des flux lumineux extrêmement faibles inaccessibles à l'œil nu). Il aboutit finalement à un enregistreur ou à un système d'affichage digital, avec ou sans imprimante, indiquant l'absorbance ou directement la concentration après action d'un calculateur approprié, de plus en plus souvent incorporé à l'appareillage (SERGE B, 1985).

I.3.4. Cellules (cuves)

La cellule d'analyse se présente sous forme parallélépipède à base de 1cm de trajet optique ayant deux faces opposées polies. Elle contient 1 à 3 ml de solution.

La tolérance d'épaisseur des cuves est de $\pm 0,005$ cm. On utilise (BURGOT.G et BURGOT.A, 2006)

- **cuves en matières plastiques** : ce sont des cuves à usage unique. Elles sont présentées en conditionnement de 100 unités provenant du même lot de fabrication et sont donc toutes identiques. Ces cuves présentent l'inconvénient d'absorber dans l'UV et ne sont donc utilisables que pour une zone de spectre limitée allant de 320 à 900 nm. Cependant, de nouveaux matériaux permettent de fabriquer des cuves autorisant des mesures dans le proche UV (jusqu'à 290 nm) ;

- **cuves en verre** : elles présentent les mêmes inconvénients d'absorption que les cuves en plastique. De plus, elles sont plus fragiles et plus coûteuses ; en revanche, elles sont résistantes aux solvants organiques. Les verres utilisées ont un indice de réfraction et une dispersion faibles. Le critère de choix d'un verre optique est la transmission dans le domaine du visible qui doit être supérieure à 80%.

- **cuves en quartz** : contrairement aux cuves en verre, les cuves en quartz permettent d'effectuer des mesures sur toute l'étendue du spectre de l'UV /visible. Le quartz présente d'autres avantages sur le verre : il a un très faible coefficient de dilatation entre 20 et 300°C, ce qui permet de travailler à des températures élevées sans modification du trajet optique ; il est indéformable à haute température jusqu'à environ 1000°C ; enfin, il est très résistant chimiquement. En revanche tout comme le verre, les cuves en quartz sont fragiles et encore plus onéreuses (HAINQUE B, BAUDIN B. et LEFEBVRE Ph, 2008).

I.3.5. Configurations des spectrophotomètres

On distingue différentes catégories de spectrophotomètres :

- **Les spectrophotomètres conventionnels :**

La lumière blanche polychromatique est décomposée dans le monochromateur qui permet de sélectionner une bande spectrale. Cette lumière traverse l'échantillon et atteint le détecteur.

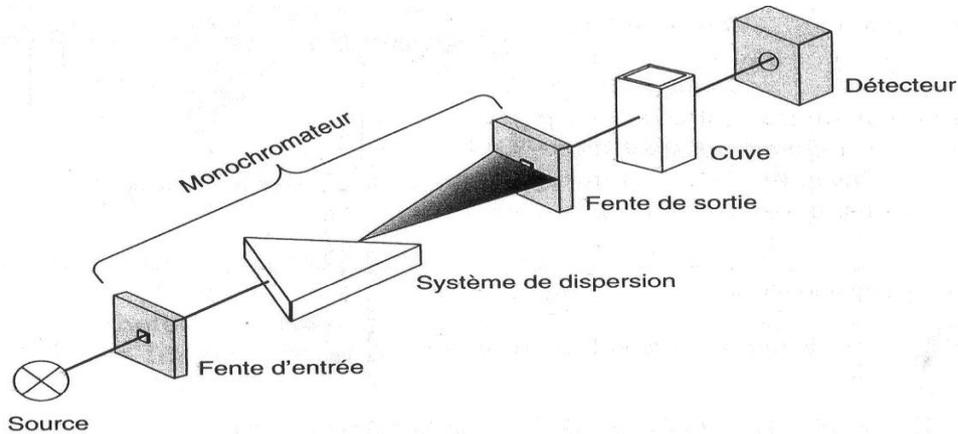


Figure n°7 : spectrophotomètre conventionnel (BURGOT.G et BURGOT.J, 2006).

- **Les spectrophotomètres à barrette de diodes.**

Une lumière blanche polychromatique traverse l'échantillon avant d'être dispersée à l'aide d'un prisme ou d'un réseau en ses différentes composantes sur une barrette de diodes. Le passage à travers l'échantillon doit être effectué avant dispersion car le principe de ce dispositif est de collecter toutes les informations en même temps pour obtenir un gain de temps.

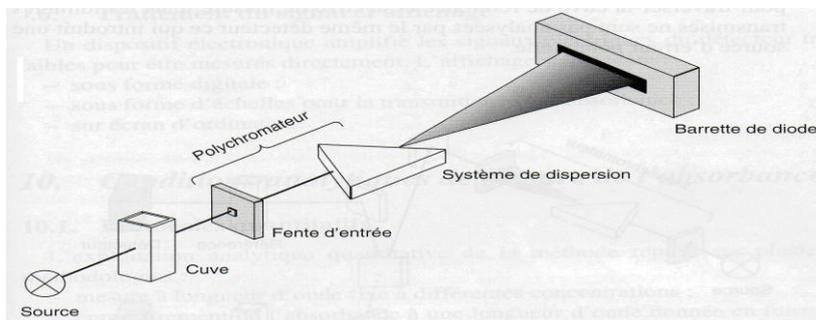


Figure n°8 : Spectrophotomètre à barrette de diodes. (BURGOT.G et BURGOT.J, 2006).

Les spectrophotomètres conventionnels ou à barrette de diodes existent sous différents configurations telles que :

– **Les spectrophotomètres à mono-faisceau**

Dans ce système, l'intensité du blanc et celle de l'échantillon sont mesurées consécutivement dans un intervalle de temps de quelques secondes à quelques minutes. Si l'intervalle est trop long, des variations d'intensité de la source lumineuse produisent des erreurs non négligeables sur les résultats :

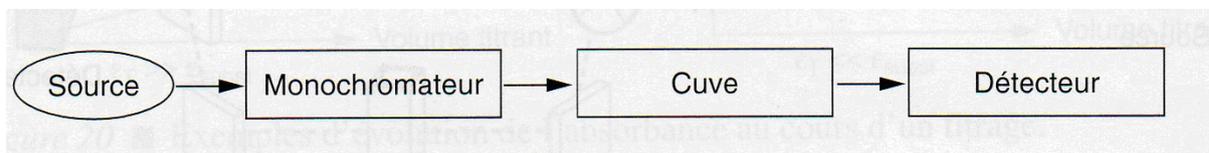


Figure n° 9: schéma représentatif d'un spectrophotomètre mono-faisceau (BURGOT.G et BURGOT.J, 2006).

– **Les spectrophotomètres à double faisceau.**

Ces configurations permettent de compenser en permanence l'absorption du solvant. Le rayonnement lumineux traverse alternativement la cuve de mesure contenant le soluté et la cuve de référence avec le solvant et les réactifs. Pour les «vrais» double-faisceau (modèle b, figure 10) un système de miroirs tournants permet au détecteur de mesurer en permanence les intensités transmises suivant l'une ou l'autre des deux voies. Avec les photodiodes, les miroirs tournants sont remplacés par des miroirs fixes. Dans le modèle a de la (figure 10) (Pseudodouble-faisceau) le rayonnement lumineux est divisé pour traverser la cuve de mesure mais les lumières transmises ne sont pas analysées par le même détecteur ce qui introduit une source d'erreur potentielle (BURGOT.G et BURGOT.J, 2006). En effet, Les meilleurs spectrophotomètres dans ce domaine restent encore les appareils à deux faisceaux dont l'un traverse l'échantillon et l'autre sert le parcours de référence. Deux miroirs tournants en forme de secteur, synchronisés avec le mouvement *pas à pas* du réseau, permettent au détecteur de comparer exactement pour la même longueur d'onde les intensités transmises par l'une ou l'autre des deux voies.

Les spectrophotomètres à double faisceau permettent de faire des mesures différentielles entre l'échantillon et le blanc analytique. Ils sont préférables aux modèles monofaisceau si les solutions sont troubles. La bande passante des meilleurs appareils peut descendre à 0,01 nm (ROUESSAC.F et ROUESSAC.A.2009).

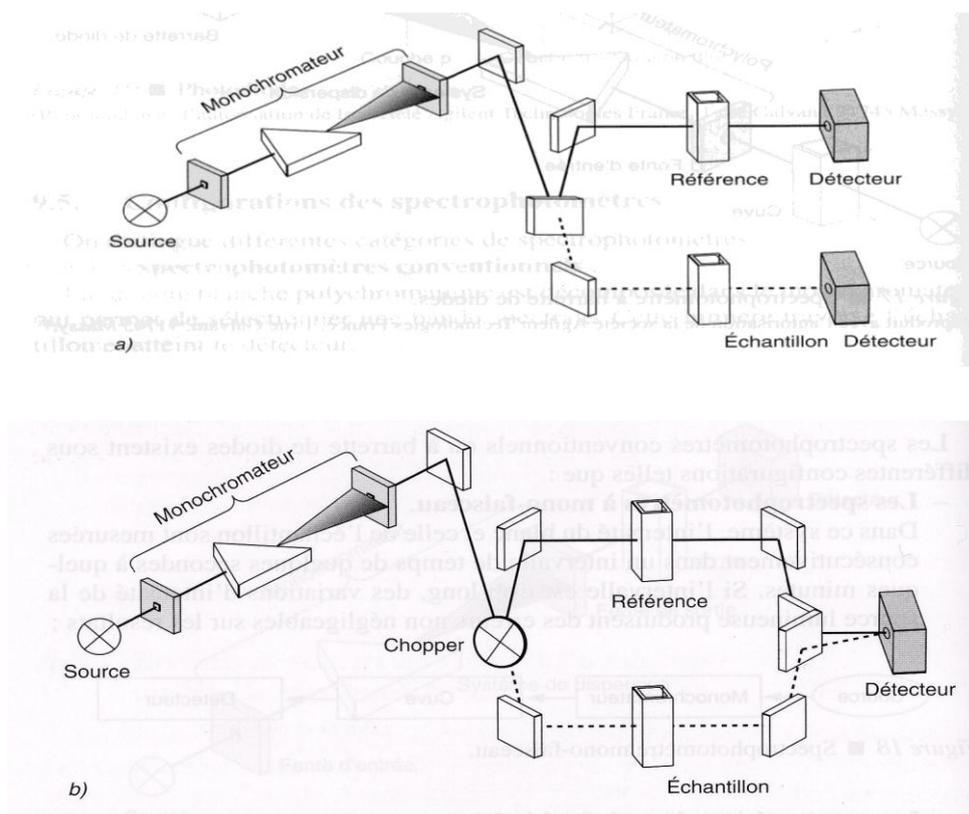


Figure n°10 : spectrophotomètre à double faisceaux (modèle a, pseudodouble-faisceau, modèle b, vrai double-faisceau).

I.4.utilisation du spectrophotomètre en biologie et en médecine

➤ En biologie :

Le spectrophotomètre est utilisé lors de la réalisation du test MTT (est une méthode rapide de numération des cellules vivantes).

En biologie moléculaire, il est utilisé lors de l'extraction d'ADN, pour le quantifier et déterminer sa pureté. On utilise la longueur d'onde **260 nm** qui est la zone d'absorbance maximale des acides nucléiques. Une seconde mesure à **280 nm** permet de contrôler la pureté de l'extraction, à savoir la présence de protéines résiduelles dans la solution d'ADN. Pour une solution d'ADN purifiée, le rapport R doit être compris entre 1,8 et 2. Si R est nettement inférieur à 1,8 alors des protéines contaminent probablement la solution. Supérieur à 2, ce rapport indique une probable contamination par des ARN.

$$R = (A_{260} - A_{320}) / (A_{280} - A_{320})$$

R est simplifié lorsque (cas fréquent) $A_{320} = 0$ (HAMANI Abdou, 2005).

➤ En biochimie :

Il est utilisé lors de la purification de protéines, pour les quantifier (longueur d'onde 280 nm) et déterminer leur niveau de pureté (longueur d'onde 260 nm).

Le spectrophotomètre est utilisé pour le dosage des enzymes et la détermination de ses activités :

Il est utilisé au cours des différentes étapes de purification, l'activité phosphatasique acide a été dosée en utilisant un milieu réactionnel composé de tampon acétate préparé dans le même tampon et de solution enzymatique. La quantité de para-nitrophénol (pNP) libéré est mesurée au spectrophotomètre UV-visible à **410 nm** contre un blanc contenant tous les réactifs à l'exception de la solution enzymatique. (EUGENE J, et al 2006).

Il est également utilisé pour la détermination des polyphénols (MOHAMDI Z, 2006)

➤ **En médecine :**

L'analyse cinétique de différentes enzymes sanguines, dosage de la phosphatase alcaline : cholestase, lactate déshydrogénase : infarctus du myocarde, hémolyse.

➤ **En pharmacie :**

Des contrôles à effectuer sur les matières premières, les produits semi-finis, les produits en cours de fabrication et les produits finis en étudiant les caractères organoleptiques: la couleur, l'uniformité, la régularité des comprimés et gélules, détermination de la teneur en principe actif lors de la phase de dosage du principe actif (HAMANI A, 2005). L'évaluation de l'activité antibactérienne de certaines substances, tel que les flavonoïdes. (ZEGHAD N, 2003).

I.5. Les avantages d'un spectrophotomètre

Le spectrophotomètre présente plusieurs avantages :

- Pas de risque d'erreur dû à des problèmes d'évaporation ou de trajet optique pas toujours très fiable.
- Récupération totale de l'échantillon
- Pas de contamination
- Procédure identique pour tous les échantillons
- Optimisation du temps d'analyse et gain de temps
- Facile d'utilisation (James H, 1978)
- un large domaine d'application
- une grande précision et une grande sensibilité.
- La simplicité et la rapidité d'utilisation; (Data Handling)

I.6. Les inconvénients d'un spectrophotomètre

Une source à spectre de raies n'offre qu'un nombre limité de longueurs d'onde, ne correspond pas nécessairement au maximum d'absorption d'une substance étudiée. En

revanche, l'inconvénient d'une source continue provient de la présence d'un monochromateur dont la bande passante a une certaine longueur, tandis qu'un spectre de raies offre des longueurs d'onde très fines (AUDIGIE Cl et al, 1995).

I.7. Les limites d'un spectrophotomètre

Domaine spectral de la spectrométrie UV-visible est limité.

Utilisé :

Pour obtenir des résultats fiables, il faut s'assurer que l'on analyse bien l'échantillon souhaité. Cette remarque est une évidence: elle constitue pourtant une des principales limitations de la spectrométrie. Le faisceau incident peut en effet être absorbé par des éléments intermédiaires:

- Par la cuve: le verre absorbe la plus grande partie du spectre IR et le lointain UV,
- par des fibres optiques (si l'appareil en comporte) à cœur silice,
- par l'oxygène de l'air: en dessous de 190 nm l'absorption par l'oxygène trouble systématiquement toutes les mesures,
- par les impuretés sur le trajet de la lumière : la vapeur d'eau, le CO₂ atmosphérique parasitent la mesure sur les appareils à simple rayon,
- par le solvant: le tableau ci-dessous indique les longueurs d'onde limites en dessous desquelles le solvant absorbe le faisceau incident.
- Déviation de la loi de Beer-Lambert : De nombreux paramètres peuvent provoquer une déviation de la loi de **Beer-Lambert**. Celle-ci n'est plus vraie quand la concentration devient trop élevée, quand une réaction modifie la composition ou le pH, ou quand il reste des impuretés. En outre elle doit être adaptée en cas de liaisons hydrogène avec le solvant, de solvataion, d'interactions molécule-molécule aux fortes concentrations, ou de fluorescence. Le calibrage doit alors faire appel à des méthodes non linéaires. Plusieurs facteurs peuvent dégrader la loi de Beer-Lambert et limiter la validité de la spectrophotométrie :
 - le domaine de mesure idéal est pour les valeurs de Transmittance (qui le rapport entre l'intensité du faisceau lumineux sortant et l'intensité du faisceau lumineux entrant) situées entre 20 et 60 % ;
 - plusieurs aberrations optiques liés à la diffusion, la réflexion et la diffraction de la lumière peuvent fausser la mesure ;
 - les phénomènes de fluorescence ainsi que d'autres particularités chimiques liées aux substances absorbantes peuvent interférer ;

- plus la densité du soluté est importante, plus le faisceau de lumière incident sera réfracté avec une valeur donnée. Cette tendance est normalement infime mais devient plus prononcée avec les hautes concentrations. Ainsi, la réfraction réduit l'intensité de la lumière transmise et l'instrument indique faussement une absorbance plus élevée. Généralement, ce phénomène peut être évité en travaillant avec des concentrations inférieures à 0,01 mol/l (James H, 1978).

Chapitre II

La lame de malassez

CHAPITRE II : LA LAME DE MALASSEZ

II.1. Définition et but

La cellule Malassez est une lame spéciale qui permet le comptage de différents types de cellules animales ou végétales contenues dans un volume précis de milieu liquide. Exemple : Cellules sanguines, chlorelles, levures...le comptage est réalisé directement sous microscope : reconnaissance visuelle d'où numération directe : nombre de cellules

$$\text{Concentration cellulaire} = \text{nombre cellules/volume de décompte}$$

L'usage premier de ces cellules de numération est le dénombrement des hématies dans le sang, d'où le nom d'hémocytomètre. Mais aussi utilisée pour le comptage des spermatozoïdes. Les numérations globulaires de différents liquides biologiques (sang, urines, liquide céphalorachidien) sont possibles, en dehors de tout automate, grâce à l'utilisation de ces cellules de verres calibrées, c'est-à-dire hématimètres. (Balédent. F, 2000).

Les cellules hématimètres permettent d'obtenir facilement une numération cellulaire de différents liquides biologiques. Différentes cellules sont utilisables selon la richesse prévisible du prélèvement en éléments et selon les habitudes de chacun :

- ✚ Les prélèvements de sang peuvent être étudiés selon les habitudes de chacun en utilisant les cellules de MALASSEZ, THOMA ou NEUBAUER.
- ✚ Les urines, on utilisera plutôt une cellule de LEMAUER,
- ✚ Les Liquides céphalorachidiens, plutôt une cellule de NAGEOTTE.

Les prélèvements riches en cellules doivent être comptés après dilution. Cette dilution est variable, et ce facteur ne doit pas être omis dans le calcul des résultats finaux. (Balédent. F, 2000)

II.2. Matériels hématimétrique :

Le matériel nécessaire pour la réalisation de la numération comprend :

1. Une cellule de comptage.
2. Des lamelles spéciales pour la cellule de comptage.

3. Des pipettes de dilution.
4. Un liquide de dilution.
5. Un microscope et une lampe.
6. Un comptage à main pour le comptage des cellules. (COLES E.H, 1979).

II.3. Les cellules hématimètres les plus utilisées

Il existe plusieurs types d'hématimètre, ils se différencient par leur quadrillage et leur volume total.

	Malassez	Thoma	Neubauer modifiée	Burker	Nageotte	Lemaur	Fuchs Rosent hal
Utilisation	Numération hématies, leucocytes et tout liquide trouble (ascite...)	Numération hématies et leucocytes	Numération hématies et leucocytes	Numération hématies et leucocytes	Cytologie urinaire et LCR	Cytologie urinaire et LCR	Cytolog ie urinaire et LCR
Taille lamelle (mm)	22*17	22*17	22*17	22*17	22*30	22*30	22*17
Taille lamelle (mm)	22*22	22*22	22*22	22*22	22*30		22*22
Profondeur	0.2 mm	0.1 mm	0.1 mm	0.1 mm	0.3 mm	0.3 mm	0.2 mm
Volume	1 mm ³	1 mm ³	0.9 mm ³	0.9 mm ³	50 mm ³	40 mm ³	3.2mm ³

Tableau n°01 : tableau comparatif des différentes hématimètres. (Balédent. F, 2000)

II.4. Description des cellules hématimètres

L'hématimètre le plus couramment utilisé est fait d'une seule pièce de verre portant deux surélévations (COLES E.H, 1979), il est caractérisé de deux chambres et chaque chambre a un quadrillage gravé sous forme des traces dont on connaît les dimensions, et une lamelle délimite une hauteur elle aussi connue. (www.aquoa.net, dernière consultation 20.06.2012.)

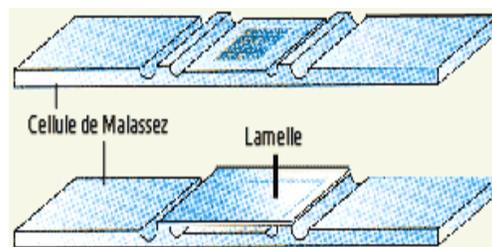


Figure n°11 à gauche : photo réelle représentant la lame de malassez.

Figure n°12 à droite : schéma représentant la lame de malassez avec une lamelle.

Les cellules peuvent être simples ou doubles, ce qui permet alors de compter deux échantillons. (Balédent. F, 2000).

II.5. Caractéristiques de la chambre de la lame de Malassez :

Le volume total de la chambre est de 1 mm^3 , la chambre est caractérisée par 10 bandes verticales et 10 bandes horizontales, une bande verticale sur deux est subdivisée dans sa largeur en cinq intervalles égaux et est composée de 10 carreaux, une bande horizontale sur est subdivisée dans sa largeur en quatre intervalles et est composée de 10 carreaux, le volume d'une bande est de $1/10 \text{ mm}^3$ et le volume d'un carreau (striés ou non) est de $1/100 \text{ mm}^3$. (www.bioforma.net, dernière consultation 15.06.2012).

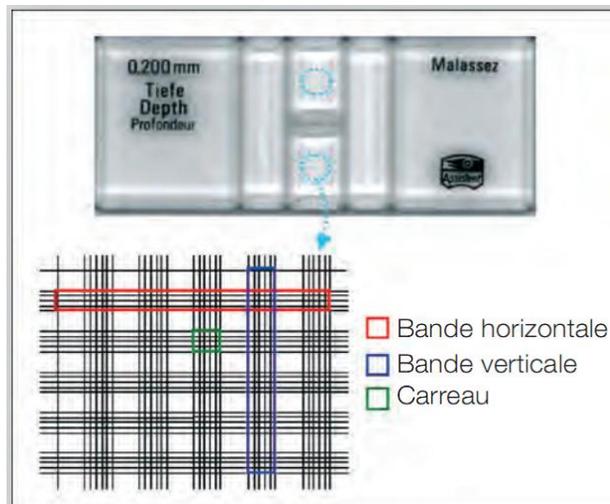


Figure n°13 : représentation du quadrillage de la lame de Malassez. (www.Bioforma.net, dernière consultation 15.06.2012)

Donc la totalité de la cellule est composée de 100 rectangles dont les dimensions sont :

- Longueur = 0,25 mm ;
- Largeur = 0,20 mm ;
- Profondeur = 0,20 mm ;

Ce qui lui confère un volume total de 1 mm^3 (0,25 mm x 2 mm x 0,20 mm).

II.6. Mode opératoire :

La préparation de l'échantillon à compter est primordiale, que le prélèvement soit dilué ou non, lorsque la suspension cellulaire est très concentrée il est nécessaire de réaliser une dilution préalable, car le grand nombre de cellules par unité de volume rend le comptage difficile. Des erreurs sont possibles au moment du calcul final, aussi faut-il être vigilant, et ne pas oublier le facteur de dilution. (Balédent. F, 2000)

Pour réaliser le remplissage de la cellule, il faut :

- Humidifier les glissières latérales sur lesquelles va reposer la lamelle.
- Déposer la lamelle sur les rebords, celle-ci doit adhérer par un "effet ventouses", en prenant soin de ne pas la graisser avec les doigts.

- En appuyant avec les deux pouces sur cette lamelle au niveau des plateaux latéraux, exercer un mouvement de va-et-vient jusqu'à perception d'une résistance et apparition de franges irisées, sans appuyer sur la partie centrale
- Placer l'extrémité de la pipette contre la lamelle et délivrer par capillarité le liquide en évitant tout débordement vers les rigoles.
- Poser l'hématimètre à plat sur la paillasse

Placer sur la platine sous le microscope, faire la mise au point au grossissement correspond.

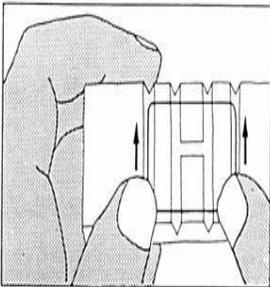


Figure n°14 à gauche: schéma représentatif le dépôt de la lamelle sur la lame de malassez

Figure n°15 à droit : photo réelle représentatif le dépôt de la lamelle sur la lame de malassez



Figure n°16: photo réelle représentant le dépôt de l'échantillon par la pipette.

II.7.principe de comptage :

Une chambre de comptage permet une numération directe et précise grâce :

- au quadrillage ;
- qui délimite une surface précise ;
- qui donne le repère visuel et permet ne pas compter 2 fois la même cellule

- et à la profondeur précise.

On totalise le nombre de cellules présentes dans chaque rectangle, arbitrairement, il est convenu de ne tenir compte que des cellules positionnées sur les côtés droits et inférieurs.

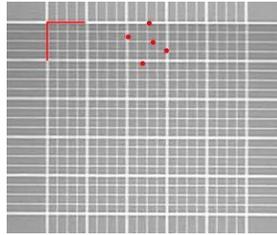


Figure n°17 : schéma représentatif le dénombrement par rectangle.

Le dénombrement se fait en choisissant 5 rectangles sur les 25 de la grille. L'opérateur est libre de choisir les 5 rectangles mais à condition qu'il effectue le comptage de la même manière pour tous les échantillons. Cependant, pour faciliter et minimiser les erreurs de recompter deux fois le même rectangle, l'opérateur doit suivre l'une des méthodes du choix des rectangles représentées dans la figure n° 17, Soit on choisit de prendre les 4 rectangles de coins et une centrale, soit on choisit les 5 rectangles de la diagonale.

On fait ensuite la somme des cellules observées dans chaque rectangle, on divise ce nombre par 5 (nombre de rectangles comptés), on obtient ainsi le nombre de cellules par rectangle, il suffit de multiplier le nombre obtenu par 100 pour connaître le nombre d'entités cellulaires par mm^3 .

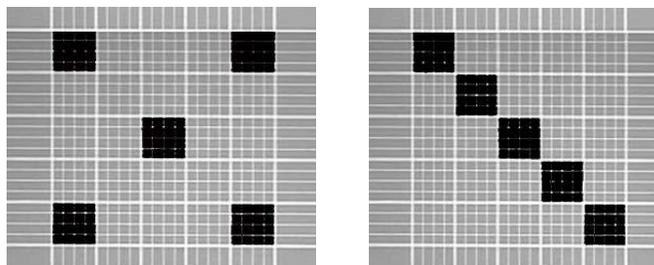


Figure n°18 : schémas représentant le choix des rectangles dans le dénombrement.

II.7.1. Procédure :

- pour les échantillons contenant moins de 10 spermatozoïdes par grand carré, il faut compter sur l'ensemble de la grille.
- pour les échantillons contenant de 10 à 40 spermatozoïdes par grand carré, il faut compter sur 10 grands carrés.
- pour les échantillons contenant plus de 40 spermatozoïdes par grand carré, il faut compter sur cinq grands carrés.
- le milieu des trois lignes blanches définit le grand carré ; les spermatozoïdes sont comptés si leur tête se situe entre les deux lignes les plus internes mais pas entre les deux lignes les plus externes.
- si un spermatozoïde se situe sur une ligne séparant deux grands carrés adjacents, il est compté uniquement s'il se situe sur le côté supérieur ou le côté droit du carré observé.
- au moins 200 spermatozoïdes dans chacune des deux chambres de la cellule sont comptés.
- seuls les spermatozoïdes entiers sont comptés (tête + flagelle).
- si les spermatozoïdes se situent sur une ligne délimitant soit un carreau soit une bande, ne compter que les spermatozoïdes présents sur la bordure droite ou gauche mais pas les deux, même remarque pour la bordure du haut et celle du bas. (www.bioforma.net, dernière consultation 15.06.2012).

“Spermatozoïdes par ml de semence= (Nombre de spermatozoïdes comptés x facteur de dilution) / (Surface considérée (mm²) x profondeurs des chambres) “

(www.aquoa.net, dernière consultation 20.06.2012.)

II.7.2. calcul de la concentration :

Exemple ci-dessous, pour une dilution standard au 1/20.

Faible concentration prévisible :

Comptage de toute la chambre, $V = 1 \text{ mm}^3$, soit X le nombre de spermatozoïdes comptés :

$$\text{Concentration} = X * \underset{\substack{\uparrow \\ \text{Dilution}}}{20} * \underset{\substack{\uparrow \\ \text{V en cm}^3 \text{ (ml)}}}{1000} = X * 20000/\text{ml}$$

Concentration intermédiaire prévisible :

Comptage des deux bandes non consécutives, $V = 1/5 \text{ mm}^3$, soit Y le nombre de spermatozoïdes comptés :

$$\text{Concentration} = Y * 20 * 5000 = Y * 10^6 / \text{ml}$$

\uparrow \uparrow
 Dilution * V en cm^3 (ml)

Forte concentration prévisible

Comptage de deux carreaux non successives, $V = 1/50 \text{ mm}^3$, soit Z le nombre des spermatozoïdes comptés :

$$\text{Concentration} = Z * 20 * 50000 = Z * 10^6 / \text{ml}$$

\uparrow \uparrow
 Dilution * V en cm^3 (ml)

-pour juger de la concordance des comptes dans les deux chambres, on calcul la différence entre les deux concentrations obtenues.

-si la différence entre les comptes est supérieure à 10 %, refaire l'analyse.

Deux exemples de calculs de concentration avec la cellule de malassez :**Exemple 1 :**

Dans la première chambre, 229 spermatozoïdes ont été comptés dans deux bandes non consécutives.

Dans la deuxième chambre, 241 spermatozoïdes ont été comptés dans deux bandes non consécutives.

La dilution est 1/2

La concentration en spermatozoïdes est $22,9 * 10^6 / \text{ml}$ pour le premier compte, et $24,1 * 10^6 / \text{ml}$ pour le deuxième.

La différence est $< 10\%$ → la moyenne est utilisée soit $23,5 * 10^6$ spermatozoïdes /ml.

Exemple 2

Dans la première chambre, 216 spermatozoïdes ont été comptés dans 2 carreaux non consécutifs.

Dans la deuxième chambre, 251 spermatozoïdes ont été comptés dans 2 carreaux non consécutifs. La dilution est 1 /20.

La concentration en spermatozoïdes est $216 * 10^6$ /ml pour le premier compte, et $251 * 10^6$ /ml pour le deuxième.

La différence est $> 10\%$ → **il faut refaire l'analyse.** (www.bioforma.net, dernière consultation 15.06.2012).

II.8. Limitations de l'examen :

Comme tout examen de laboratoire, il faut prendre en considération certains facteurs entraînant des variations avec : prélèvement, la dilution, et la numération.

-Erreurs liées au prélèvement : le matériel de récolte mouillé ou souillé

-Erreurs de dilution : bien que la plupart des pipettes de dilution soient fabriquées avec précision, leur choix ne doit pas se faire uniquement sur leur prix mais sur leur erreur propre. Il est préférable d'utiliser des pipettes et des hématimètres certifiés par le fabricant ou par un organisme officiel. Cependant, l'erreur la plus fréquente n'est pas due aux matériels mais à l'opérateur.

-Erreurs de numération : les erreurs dans la numération totale sont dues le plus souvent à un mauvais éclairage du microscope et à un examen et à un comptage non soigneux des cellules. Comme il est difficile de différencier les cellules des particules de débris, l'utilisation de matériels ou de liquide de dilution sales peut entraîner des numérations fausses par excès. Il faut prendre soin d'éviter de souiller le liquide de dilution. Car la présence d'une quantité même petite d'un prélèvement antérieur peut modifier les résultats. L'identification correcte des cellules est un autre facteur limitant de la précision de numération totale des cellules. Cette identification dépend des connaissances de l'opérateur effectuant la numération et la qualité de prélèvement. (COLES E.H, 1979).

Chapitre III

La courbe d'étalonnage

CHAPITRE III : ETALONNAGE DU SPERME

III.1.Définition de l'étalonnage

La courbe d'étalonnage est la représentation graphique, exprimée en unité d'absorbance ou en unité de transmittance, d'une substance de concentrations variables mais connues et mesurés photométriquement à une longueur d'onde fixe pour laquelle elle a maximum d'affinité. (CARRIER R, 1971)

L'étalonnage est utilisé lorsque un appareil est en cours de mise en service au laboratoire il est ainsi définit comme étant l'établissement de la relation de la proportionnalité, de ses limites entre la concentration c du produit à doser et la réponse de l'appareil. Un graphique de ce type établit la linéarité de la réponse $y=kc$, puis au-delà de c_M , dite la concentration limite de la linéarité, la réponse non linéaire. Ce graphique établit aussi la sensibilité de la méthode avec le rapport dy/dc dans la zone linéaire. (SERGE B, 1985)

L'étalonnage d'un est une opération qui concerne les appareils de mesure ou de restitution de données. Deux appareils différents — de conception différente, mais aussi deux appareils de la même gamme (même marque, même modèle) — ne réagissent pas exactement de la même manière. Il faut donc une procédure permettant d'obtenir le même résultat à partir de la même situation initiale. (Journal officiel, 1998). On utilise une courbe de référence, nommée courbe d'étalonnage, pour effectuer un dosage par une méthode physique (SERGE B, 1985).

III.2.Objectif de l'étalonnage

La courbe de calibration sert à plusieurs fins dont :

- La vérification de la loi de Beer-Lambert ; il est dit d'une méthode colorimétrique qu'elle suit la loi de Beer-Lambert lorsque la ligne de calibration est une droite. au contraire elle ne suit pas la loi de Beer-Lambert lorsque la ligne de calibration est une courbe.

Le calcul des résultats au cours de l'analyse courante ; l'utilisation de la courbe de calibration est essentielle lorsque la méthode ne suit pas la loi de Beer-Lambert. Elle est facultative dans le cas contraire. (CARRIER R, 1971)

Cette courbe d'étalonnage permet de retrouver la concentration inconnue de la solution à doser à partir de la mesure de la grandeur physique choisie (www.lemonde.fr) date de dernière consultation 20/06/2012.

Elle permet de déterminer une absorbance à une longueur d'onde donnée, pour une cuve donnée de largeur donnée, pour une concentration recherchée (fr.wikipedia.org) date de dernière consultation 21/06/2012.

- Lorsqu'on se trouve en présence d'une solution d'une espèce déterminée, plusieurs solutions s'offrent à nous pour déterminer sa concentration dans la solution, c'est-à-dire pour effectuer un dosage (Henkel J, 1978).

III.3.Principe de l'étalonnage

Lors d'un dosage par étalonnage, on cherche à déterminer la concentration de l'espèce x dans la solution S (concentration molaire: $[x]_S$ en mol.l^{-1} ou concentration massique t en g.l^{-1}).

Par connaissance de spectre d'absorption de la substance chimique, on peut mesurer, à l'une de ses longueurs d'onde λ_{max} (là où l'absorption est maximale) les variations de l'intensité I d'un faisceau lumineux traversant une même épaisseur l de solutions de concentrations diverses.

Ceci permet d'établir expérimentalement la courbe $A = f(c)$ reliant l'absorbance et la concentration de la substance étudiée (avec $l = 1 \text{ cm}$), en effectuant les mesures de A pour diverses concentrations. Cette courbe est une courbe d'étalonnage.

La courbe expérimentale d'étalonnage permet ensuite de déterminer la concentration inconnue d'une solution de cette substance par simple mesure de son absorbance et report sur le graphe $= f(c)$.

La loi de Lambert-Beer a des limites. Elle n'est linéaire que dans un intervalle de concentrations réduit regroupant des valeurs inférieures à $10^{-2} \text{ mol.l}^{-1}$. (Henkel J, 1978)

On mesure une grandeur physique M_S liée à la concentration $[x]_S$ dans la solution S. On cherche en général une fonction linéaire $M = k.[x]$;

On établit une série de dilution arithmiques (et non pas géométriques) de la solution à analyser (RICHTERICH R ,1967) c'est-à-dire, on prépare une gamme de solutions étalon de différentes concentrations de l'espèce X : $[x]_1 [x]_2 \dots [x]_n$ etc. (<http://www.maxicours.com>) date de dernière consultation 20.06.2012.

On mesure l'extinction vis-à-vis de la valeur à blanc et on porte les résultats sur papier et l'on tire une droite par les différents points obtenus. (RICHTERICH R ,1967)

III.4.Réalisation de la courbe d'étalonnage

A partir d'une solution mère aqueuse préparée, des solutions filles sont ainsi préparées de différentes concentrations. La lecture de l'absorbance de chaque solution est effectuée à l'aide d'un spectrophotomètre à une longueur d'onde propre à chaque substance contre un blanc (BENAROUS K ,2006) cette courbe de référence est nommée : la courbe d'étalonnage.

On réalise une série de mesures d'une grandeur physique donnée pour des solutions de concentrations connues afin de tracer la courbe d'évolution de cette grandeur en fonction de la concentration (www.assistancescolaire.com) date de dernière consultation 20/06/2012.

On peut tracer une courbe représentant la valeur réelle du paramètre en abscisse et la valeur mesurée en ordonnée. Dans les cas simples, la courbe est une droite appelée droite d'étalonnage, la dérive systématique est l'ordonnée à l'origine et la dérive de sensibilité est la différence entre la pente de la droite et la pente théorique (qui est 1, car on doit avoir $x=y$, c'est-à-dire que la valeur mesurée est égale à la valeur réelle) (Figure N° 19).

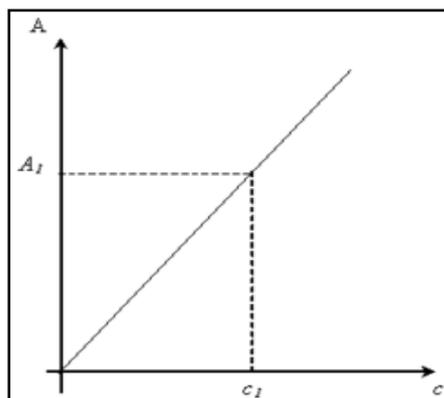


Figure n° 19 : représentation de la courbe théorique d'étalonnage. Web

Dans le cas d'un étalonnage parfait, la droite d'étalonnage est la première bissectrice. Dans ce cas-là au moins deux étalons sont nécessaires pour pouvoir établir la droite d'étalonnage.

On peut avoir des courbes d'étalonnage plus complexe, nécessitant plus d'étalons. Chaque mesure étant entachée d'erreur, y compris la mesure des étalons, on effectue en général plusieurs mesures du même étalon, ou bien on utilise plus d'étalons que nécessaire et l'on détermine la courbe d'étalonnage par régression linéaire. (Journal officiel, 1998)

Cependant, dans le cas où l'étude de l'adéquation du modèle considéré comme linéaire. Il convient d'étudier tout particulièrement les résidus ; les points suspects sont recherchés et éventuellement éliminés après justification. L'étude de l'adéquation du modèle linéaire est en suite de nouveau effectué. (EL MRABET K ,2001)

Cependant les modalités de la mise en jeu d'une gamme étalon de type classique, par exemple sur une chaîne simple d'auto-analyseur en flux continue. Malgré les progrès indiscutables par la diversification des sérums étalon ou la mesure en valeur absolue de l'absorbance des chromogènes, ce type d'étalonnage traditionnel conservera longtemps encore sa valeur référentielle par exemple : on pèse très exactement dans un solvant approprié

La quantité correspondante à $200\mu\text{mol}$ du paramètre $x\dots$ par dilution successive, on en tire la *GAMME ETALON* de ce type (figure N° 20) :

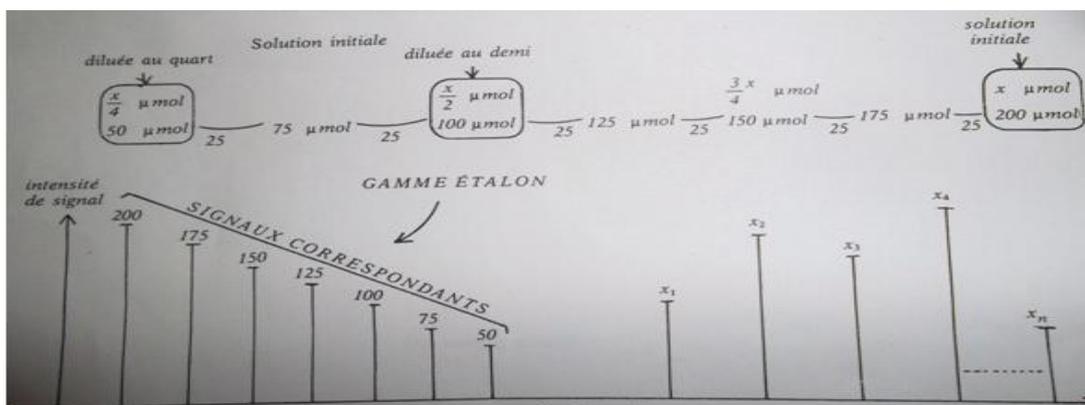


Figure n°20: succession des échantillons de concentrations connues, puis inconnues
(BERNARD S, 1985)

Les concentrations indéterminées $x_1, x_2, x_3\dots x_n$ sont déterminées par interpolation entre deux points de la gamme étalon. On remarque que le signal x_4 est plus intense que celui du point le plus élevé de la gamme : on dit qu'il "sort" de la gamme. Pour l'y faire "rentrer", on dilue au demi l'échantillon correspondant, en multipliant par 2 le résultat finale.

En pratique courante, réalise rarement plusieurs points, on se contente de la valeur la plus haute et la valeur la plus basse avec deux ou trois valeurs intermédiaires pour vérifier la linéarité. (BERNARD S, 1985).

III.5.Présentation de la courbe d'étalonnage

Il ya quatre façons de présenter une courbe de calibration :

III.5.1.Transmittance par rapport à la concentration sur papier métrique (figure N°21).

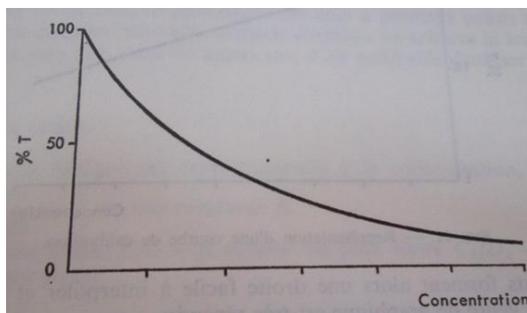


Figure n°21 : représentation de la courbe d'étalonnage : Transmittance par rapport à la concentration sur papier métrique (CARRIER R ,1971)

Les résultats formeront, dans l'ensemble, une courbe. Ce genre de graphique n'est pas recommandable, parce qu'il ne permet pas d'interpoler ou d'extrapoler de façon précise.

III.5.2.Logarithme de la transmittance par rapport à la concentration sur papier métrique (figure N°22).

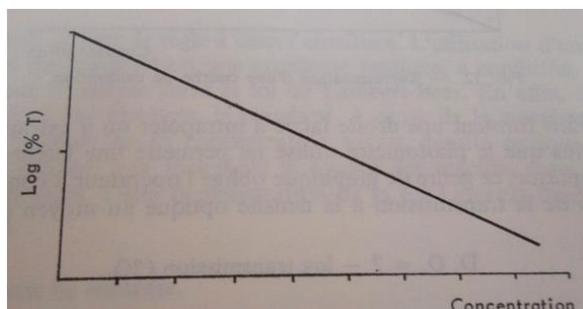


Figure n°22 : représentation de la courbe d'étalonnage : Logarithme de la transmittance par rapport à la concentration sur papier métrique (CARRIER R, 1971)

Les résultats forment généralement, une droite facile à utiliser. Cependant, le type de graphique oblige l'opérateur à convertir chacune de transmittance en son logarithme avant de pouvoir en déduire la concentration équivalente.

III.5.3.La transmittance par rapport à la concentration sur papier semi-logarithme (figure N° 23)



Figure n°23 : représentation de la courbe d'étalonnage : transmittance par rapport à la concentration sur papier semi-logarithme (CARRIER R, 1971)

Les résultats forment alors une droite facile à interpoler et à extrapoler, l'usage de ce genre de graphique est très répandu.

III.5.4. Densité optique par rapport à la concentration (figure N°24).

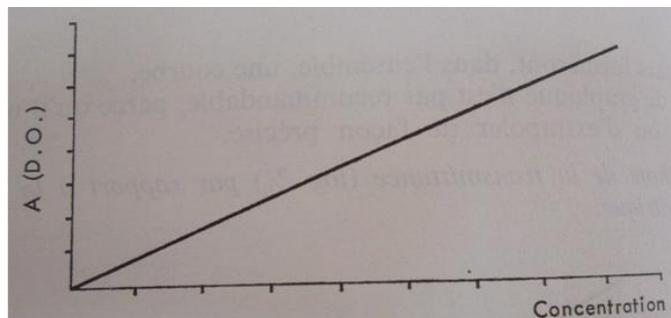


Figure n°24: représentation de la courbe d'étalonnage : Densité optique par rapport à la concentration (CARRIER R, 1971).

Les résultats forment une droite facile à interpoler et à extrapoler, cependant, à genre de graphique oblige l'opérateur à convertir chacun des résultats de la transmittance à la densité optique au moyen de la formule suivante :

$$DO = 2 - \log \text{transmittance } (\%). \text{ (CARRIER R, 1971)}$$

III.6.Méthode de calcul des résultats

Pour évaluer les erreurs ou la certitude de dosage on compare une courbe d'étalonnage dite personnelle à la courbe d'étalonnage dite préfabriquée :

III.6.1.Courbe préfabriquée

La courbe de calibration préfabriquée est une courbe préparée par les sociétés commerciales et fournit avec les spectrophotomètres. Elle n'est pas à recommander en pratique courante. Tout au plus peut-être utilisée au début en attendant que l'acheteur ait établi sa propre courbe de calibration.

III.6.2.Courbe de calibration personnelle

Courbe de calibration personnelle est utile à plusieurs points de vue et indispensable dans les cas où la méthode d'analyse ne suit pas la loi de Beer-Lambert. Il reste que, dans les autres cas, il est préférable d'utiliser une solution étalon. (CARRIER R, 1971)

III.7.Les modalités de l'étalonnage

III.7.1.Méthode de l'étalonnage externe

Il est nécessaire de disposer d'une quantité suffisante du produit afin de faire une courbe d'étalonnage $Aire = f$ (masse ou concentration du produit), pour un volume injecté constant V . L'injection ultérieure du même volume V de l'échantillon à doser permet, à l'aide de la mesure de l'aire du pic reportée sur la courbe d'étalonnage, de connaître la masse ou la concentration recherchée. Cette méthode est plus précise que celle qui consiste à ne faire qu'une mesure avec l'étalon et à utiliser une règle de trois :

$$A_e/M_e = A_{et}/m_{et} \text{ où :}$$

A: Aire des pics, e : échantillon, et : étalon, m : masse du produit remplaçable par la concentration (figure N°25) (www.ac-nancy-metz.fr) date de dernière consultation 22.06.2012.

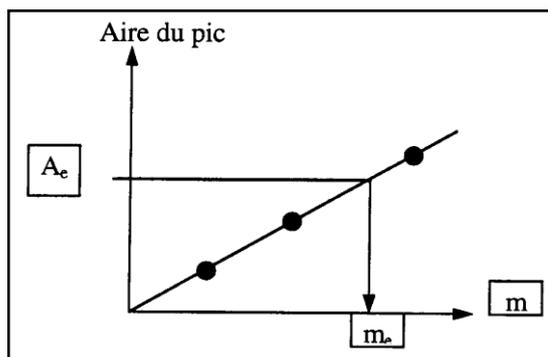


Figure n° 25: courbe d'étalonnage par méthode de l'étalonnage externe. Web

III.7.2. Méthode de l'étalonnage interne

On choisit un corps qui absorbe dans un domaine différent de longueurs d'onde que le corps à doser et on l'ajoute en concentration connue à la solution. On effectue les mesures à deux longueurs d'onde, l'une pour l'étalon interne et l'autre pour le corps à doser (CHARLOT G, 1978).

On compare la réponse du ou des produits à analyser à celle d'un étalon interne, donc introduit dans le mélange à doser et convenablement choisi.

Une solution étalon est préparée avec le ou les produits que l'on veut doser. Les masses sont connues m'_1 , m'_2 , et ... m_e pour l'étalon ; à ces masses correspondent les aires A'_1 , A'_2 , ..., A'_e , sur le chromatogramme.

Dans l'échantillon contenant les masses m_1 , m_2 , ... de solutés on ajoute m_e de l'étalon, ce qui donne les aires A_1 , A_2 , A_e .

$$\text{On obtient : } m'_1 = \alpha_1 A'_1, m'_2 = \alpha_2 A'_2, m_e = \alpha_e A'_e$$

Avec α coefficient de proportionnalité

$$\text{et } k_1 = (\alpha_1 / \alpha_e) = (m'_1 A'_e / m_e A'_1)$$

D'où la valeur k_1 puisque toutes les données sont connues.

Dans l'échantillon inconnu on aura : $m_1 = \alpha_1 A_1$, $m_e = \alpha_e A_e$, $(m_1/m_e) = (\alpha_1 A_1 / \alpha_e A_e) = k_1 (A_1/A_e)$, m_e , k_1 , A_1 , A_e sont connus (www.ac-nancy-metz.fr) date de dernière consultation 22.06.2012.

III.7.3. Méthode des ajouts

Comme la précédente, cette méthode nécessite de posséder le produit à analyser pur; après avoir analysé l'échantillon, on ajoute à celui-ci des quantités connues Δm du produit avant de le chromatographier à nouveau (faire au minimum deux ajouts), ce qui entraîne une variation de l'aire du pic ΔA .

Si m est la masse contenue dans l'échantillon à analyser, $(\Delta A / \Delta m) = a/m$ soit $m = A * (\Delta m / \Delta A)$
 Si le produit ajouté est en solution, il faut tenir compte des effets de dilution (figure N°26)
 (www.ac-nancy-metz.fr) date de dernière consultation 22.06.2012.

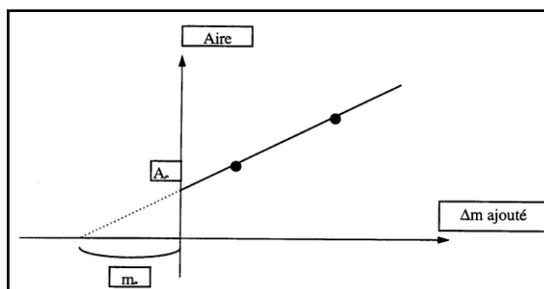


Figure N° 26: courbe d'étalonnage par méthode des ajouts. web

III.8. Les différents types d'étalon

Il existe deux types d'étalon :

III.8.1. Etalon primaire ou solution standard

Il s'obtient par dissolution dans un volume connu de solvant exactement pesée d'une substance chimique de pureté déterminée. La pesée, la pureté du solvant sont évidemment des référentiels supposés parfaits. La substance chimique doit être stable, de composition définie, donner lieu à des réactions chimiques complètes, résister à la dessiccation entre 105⁰C et 110⁰ C (pour pouvoir s'il ya lieu, conserver cette solution standard à l'état sec), avoir également un PM suffisamment élevé pour réduire les erreurs de pesée.

Exemple d'étalon primaire : Ion sodium à 140mmol/l : solution de NaClO, 14M (8,19g/l) dans l'eau distillée, glucose à 5mmol/l : solution de glucose anhydre 0,9g/l dans une solution saturée d'acide benzoïque-protéines sériques, solution d'albumine humaine pure 50g/l dans une solution NaCl 0,15M. Bien entendu, le conservateur éventuel qui stabilise les étalons ne doit pas modifier la qualité de l'analyse.

III.8.2. Etalon secondaire

Il concerne les substances chimiques dont le degré de pureté n'est pas suffisant pour constituer un étalon primaire. Exemple : soit une solution d'albumine humaine pure constituant un étalon primaire de protéine. Pour apprécier l'azote protéique, on dosera par rapport à un étalon primaire de sulfate d'ammonium. (BERNARD S, 1985)

III.9.L'incertitude de l'étalonnage

L'évaluation de la précision des mesurages de turbidité avec les formules analytiques classiques donne des résultats inexacts car:

- la dispersion des mesurages augmente avec la valeur mesurée;
- ces formules ne prennent pas en compte l'incertitude sur les étalons (mesurée ou indiquée par le fabricant).

L'incertitude d'étalonnage pour une valeur étalon x_0 donnée, peut être exprimée par l'écart type au carré (variance) selon différentes expressions (ou formules). Ces expressions sont valides avec les hypothèses de dispersion constante des mesures en fonction de la valeur mesurée et d'incertitude négligeable sur les étalons (figure°27) (RUBAN G., JOANNIS C., DERRIEN A.-S).date de dernière consultation 22.06.2012.

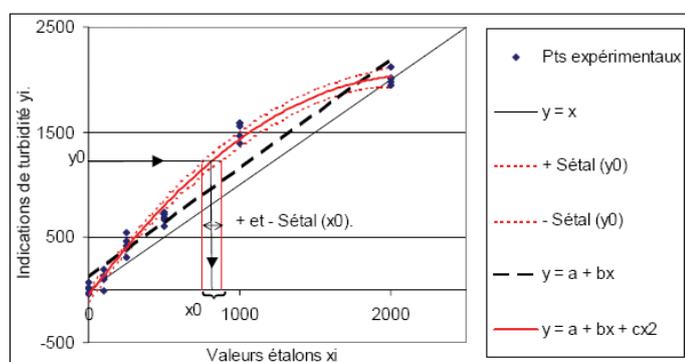


Figure n°27 : Exemple de droite et courbe d'étalonnage avec les incertitudes associées.

Les principales causes du défaut d'adéquation au modèle d'étalonnage linéaire sont d'une part l'étude d'un trop grand domaine de concentrations et d'autre part, l'existence de données suspectes ayant par exemple un écart de non linéarité supérieur aux autres points de la gamme et pouvant être dues à des problèmes analytiques. Dans tout les cas une incertitude de modélisation est associée aux différents résultats. Son expression est indiquée sur le logigramme cde décision. (EL MRABET K, 2001).

Théoriquement, la droite de l'étalonnage passe par l'origine des coordonnées puisque $A = 0$ quand $c=0$ (loi de Beer-Lambert). Cependant, cela n'est pas toujours le cas. En effet, les cuves peuvent varier légèrement en taille et en composition d'un lot à l'autre. Si les deux cuves utilisées pour la référence et pour la mesure ont une taille différente, l'erreur sera constante, quelle que soit la longueur d'onde de mesure. En revanche, s'il s'agit d'une différence de composition du matériau, cela n'aura d'influence que pour certaines longueurs d'ondes. (HAINQUE B, BAUDIN B, LEFEBVRE P, 2008).

Si la courbe d'étalonnage ne représente pas de relation entre l'extinction et la concentration, on parle alors d'**écart avec la loi de Beer**. Ces écarts peuvent être répartis dans les deux sous-groupes suivants :

- **Cause chimique**

Les soi-disant vrais peuvent provenir d'effets du milieu (dans le genre des erreurs des sels et des protides d'indicateurs). Plus souvent, on doit les attribuer au fait que la réaction chimique qui provoque la couleur n'évolue pas de façon stœchiométrique. Un exemple de ce genre est représenté par la détermination de l'ammoniaque avec le réactif de NESSLER et de celle de la détermination de l'albumine selon FOLIN.

- **Cause physique**

De faux écarts avec la loi de Beer sont presque toujours dus à l'emploi de la lumière non monochromatique lors de la mesure. S'il existe un écart avec la loi de Beer, cela ne signifie pas que la méthode est inutilisable, mais souvent, c'est seulement pour des fortes concentrations il ya un écart, en plus on peut souvent éviter un écart de la droite en utilisant d'autres concentrations de réactif. (RICHTERICH R , 1967)

La partie expérimentale

Matériels et Méthodes

I.1. Echantillons :

Le sperme de dinde nous y procurer d'un élevage de reproducteurs dindes à Ain Ouassara dans la wilaya de Djelfa. Les animaux, qui ont fait l'objet de la récolte de la semence, sont de deux âges différents (28 et 56 semaines d'âge).

La semence est conservée immédiatement dans un dilueur-conservateur (NaCl et Formol) après une dilution de 1/100 dans des Ependorff.

Le nombre d'échantillons à doser, en fonction de l'âge est de :

- 13 de semence de dindons âgés de 28 semaines ;
- 08 de semence de dindons âgés de 56 semaines.

I.2. Mesure par spectrophotomètre :

I.2.1. Matériels :

- Spectrophotomètre utilisé du laboratoire de biochimie de l'ENSV est de Le modèle « 6705 Spectrophotometer JENWAY® ». Ce modèle 6705 couvre une gamme spectrale de 190 à 1100 nm avec une bande passante de 4 nm.
- Cuve TO 10 mm en Quartz.
- Micropipette 1000 µl.
- Sérum physiologique pour la dilution à 1/5.

I.2.2. Méthode de dosage :

- ✓ On a réglé le spectrophotomètre sur une longueur d'onde 540 nm par et on a déterminé le zéro d'absorbance sur le « blanc » qui correspond au dilueur sans spermatozoïdes.
- ✓ On a réalisé une dilution de 1/5 de la suspension initiale pour avoir une meilleure absorbance.
- ✓ On a utilisé de l'eau physiologique (NaCl à 9 g/L) comme liquide de dilution et on a bien agité chaque cuvette avant la mesure.
- ✓ On a mesuré l'absorbance de chaque cuvette.

I.3. Comptage à la Malassez

I.3.1. Matériels :

- Microscope optique ;
- Lame de Malassez ;
- Lamelles ;
- Micropipettes 100 μ l ;

I.3.2. Méthode de comptage :

- 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, 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.

II.1. Courbe d'étalonnage du spectrophotomètre pour la détermination de la concentration de la semence de dindes.

La figure n°28 représente un nuage de points reliant par paire la densité optique (absorbance) de chaque concentration spermatique calculée. On remarque une grande dispersion des points, montrée par le coefficient de corrélation $r = 0,53$ (dont $r = \sqrt{R^2}$). Cette dispersion est mieux mise en relief par la courbe de tendance polynomiale du 2^{ème} degré dont on peut apercevoir nettement dans la surface délimitée entre la courbe et la droite de corrélation.

En conséquence, toute laisse supposer qu'il y a des erreurs, soit dans la mesure de l'absorbance ou soit dans le calcul de la concentration spermatique. La première hypothèse est écartée en vue de l'exactitude de l'appareil et la non-intervention du facteur humain. Par contre, des erreurs de comptages peuvent être commises lors du calcul de la concentration spermatique, pour plusieurs raisons à savoir :

- Le facteur échantillon : l'échantillon lui-même peut être une source d'erreur s'il était contaminé par d'autres matières, par inadvertance (biologiques : bactéries ... ou physiques) capable de surestimer la densité optique.
- Le facteur humain : en vue que le comptage est effectué par plusieurs opérateurs (3 étudiants) qui chacun a sa propre qualité visuelle et aussi relativement moins expérimentés.

Afin d'atteindre notre objectif qui est de déterminer une relation mathématique (équation) entre l'absorbance et la concentration spermatique pour l'espèce dinde, on a voulu savoir si l'aberration statistique est liée aux groupes d'échantillons, c'est-à-dire aux échantillons de semence issus des mâles âgés de 28 semaines ou ceux âgés de 56 semaines. Les résultats sont montrés dans les figures n° 28 et 29.

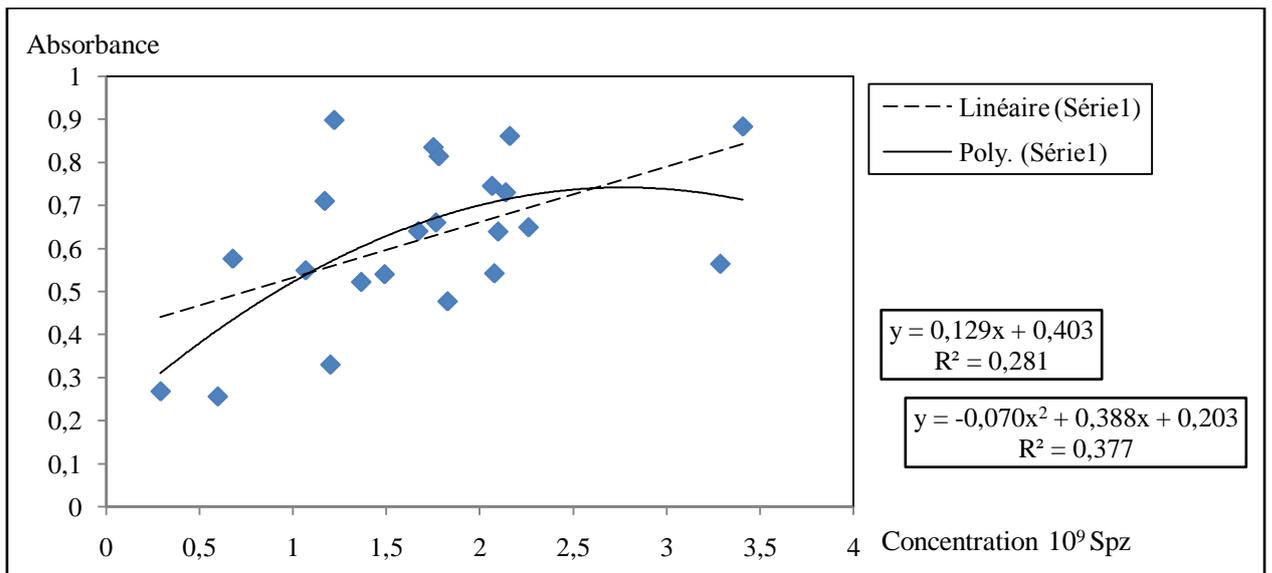


Figure n° 28 : courbe de corrélation représentant l'étalonnage du spectrophotomètre pour le calcul de la concentration de la semence Dinde.

II.2. Etalonnage du spectrophotomètre pour la semence des dindons en fonction de l'âge

II.2.1 Courbe d'étalonnage du spectrophotomètre pour la semence des dindons de 28 semaines d'âge

On remarque sur la figure n° 29 que la dispersion est aussi plus prononcée par rapport à celle de tous les échantillons, tous âges confondus ($R^2 = 0,043$ vs $R^2 = 0,2811$) où le coefficient de variation est de 0,20 vs 0,53 respectivement. Cet état des lieux, nous ne laisse pas élarger, fidèlement, une formule reliant la densité optique avec la concentration spermatique. Donc, des mesures de corrections doivent être apportées pour atteindre notre objectif.

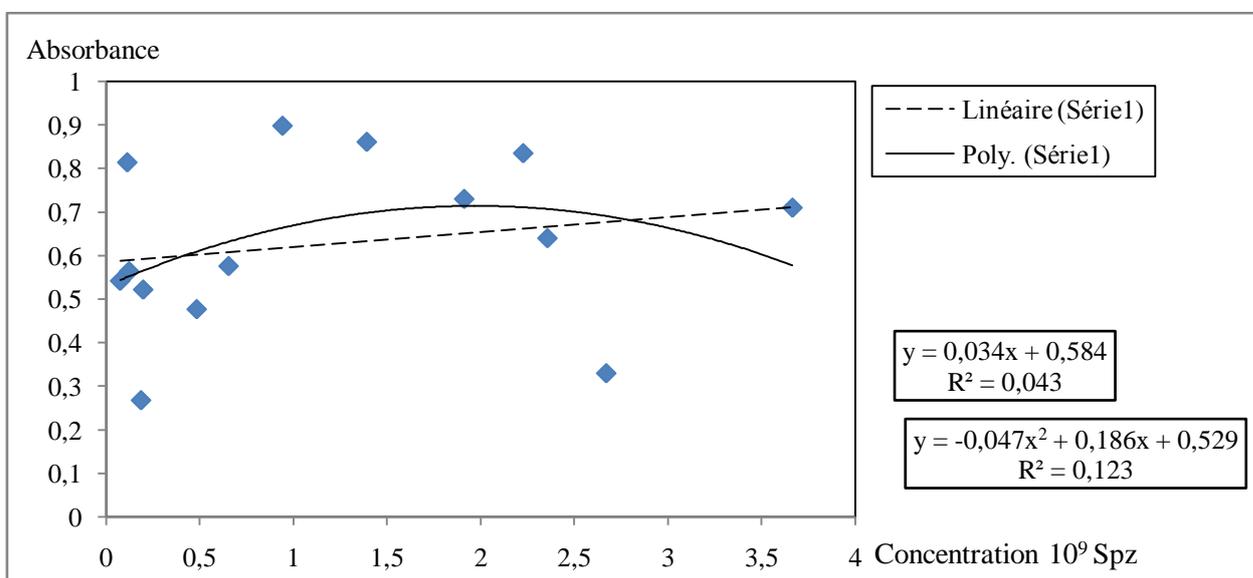


Figure n° 29 : courbe de corrélation représentant l'étalonnage du spectrophotomètre pour le calcul de la concentration de la semence des dindons de 28 semaines d'âge.

II.2.2. Courbe d'étalonnage du spectrophotomètre pour la semence des dindons de 56 semaines d'âge :

Concernant les échantillons issus des dindons de 56 semaines d'âge, on remarque sur la figure n° 30 que la dispersion est nettement moindre notée par un $R^2 = 0,8869$ soit $r = 0,92$. Ce résultat peut nous laisser dire que l'équation peut être retenue pour déterminer la relation entre l'absorbance et la concentration spermatique : $y = 0,1972x + 0,2515$, où y représente l'absorbance et x la concentration spermatique.

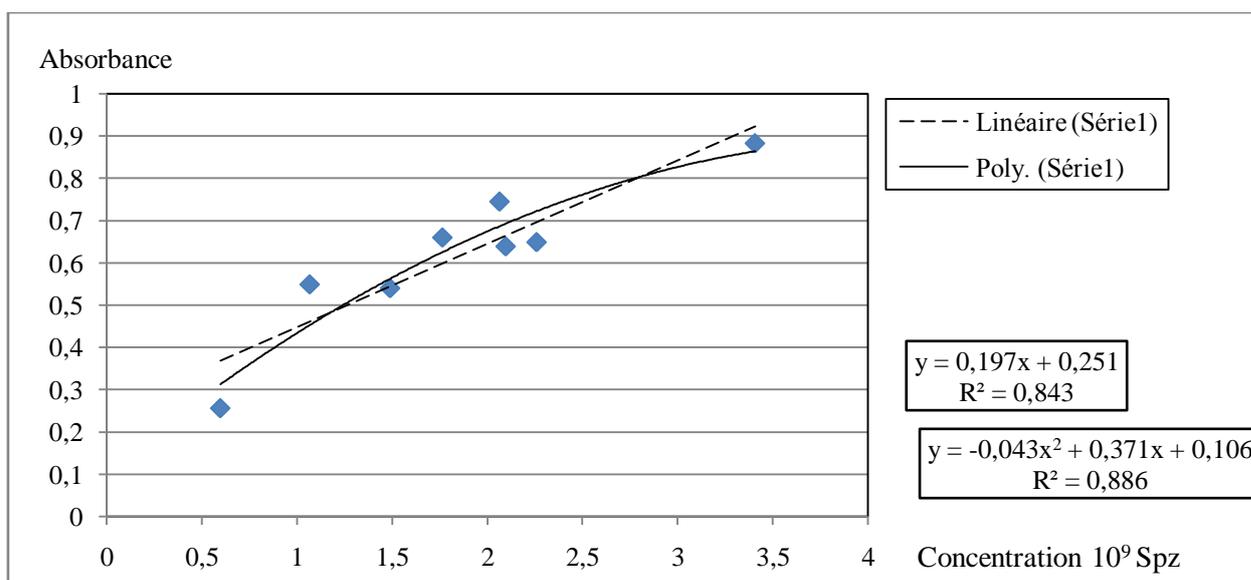


Figure n° 30 : courbe de corrélation représentant l'étalonnage du spectrophotomètre pour le calcul de la concentration de la semence des dindons de 56 semaines d'âge.

II.3. Correction de la courbe d'étalonnage.

Les corrections apportées sont faites par la manière suivante : On a commencé par détecter les différentes aberrations statistiques afin de les enlever. On a considéré une aberration statistique tous les points qui s'éloignent énormément de la droite de corrélation. Et à chaque fois qu'on enlève une valeur, on calcule le R^2 . On continue cette opération jusqu'à avoir un R^2 proche de la valeur « 1 », c'est-à-dire de 0,95 jusqu'à 0,99. Puis, on a généré les graphes suivants :

II.3.1. Courbe d'étalonnage du spectrophotomètre pour la semence des dindons de 28 semaines d'âge après correction

Après avoir ôté les aberrations statistiques, qui sont de nombre de 08, la relation entre les « x » et les « y » apparaît nettement, d'abord dans le $R^2 = 0,953$ soit le coefficient de corrélation $r = 0,98$ et en suite par la superposition de la courbe de tendance polynomiale avec la droite de corrélation comme il est représenté sur la figure n°31. Ce constat, laisse dire une forte intimité entre la formule de calcul de la concentration spermatique à partir d'une densité optique mesurée. La formule est comme suit : $y = 0,046x + 0,5382$.

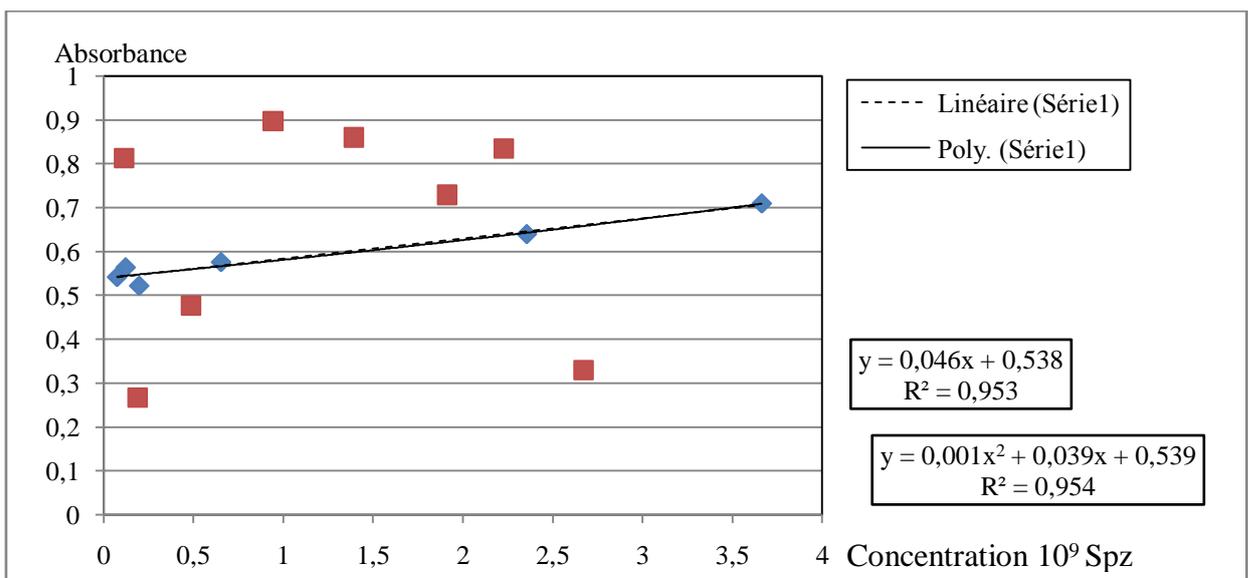


Figure n° 31: courbe de corrélation représentant l'étalonnage du spectrophotomètre pour le calcul de la concentration de la semence des dindons de 28 semaines d'âge après correction.

II.3.2. Courbe d'étalonnage du spectrophotomètre pour la semence des dindons de 56 semaines d'âge après correction

La correction de la courbe d'étalonnage du groupe d'échantillons des dindons âgés de 56 semaines présentée sur la figure n°32 n'a pas nécessité l'enlèvement de beaucoup de valeurs. Elles sont de nombre de 02. Par cet effet, le R^2 est égal à 0,9273 soit $r = 0,96$ et d'un autre côté l'écart entre la courbe de tendance et la droite de corrélation est réduit jusqu'à presque la superposition des courbes. Ainsi la formule de la relation qui y découle est : $y = 0.2121x + 0,1938$.

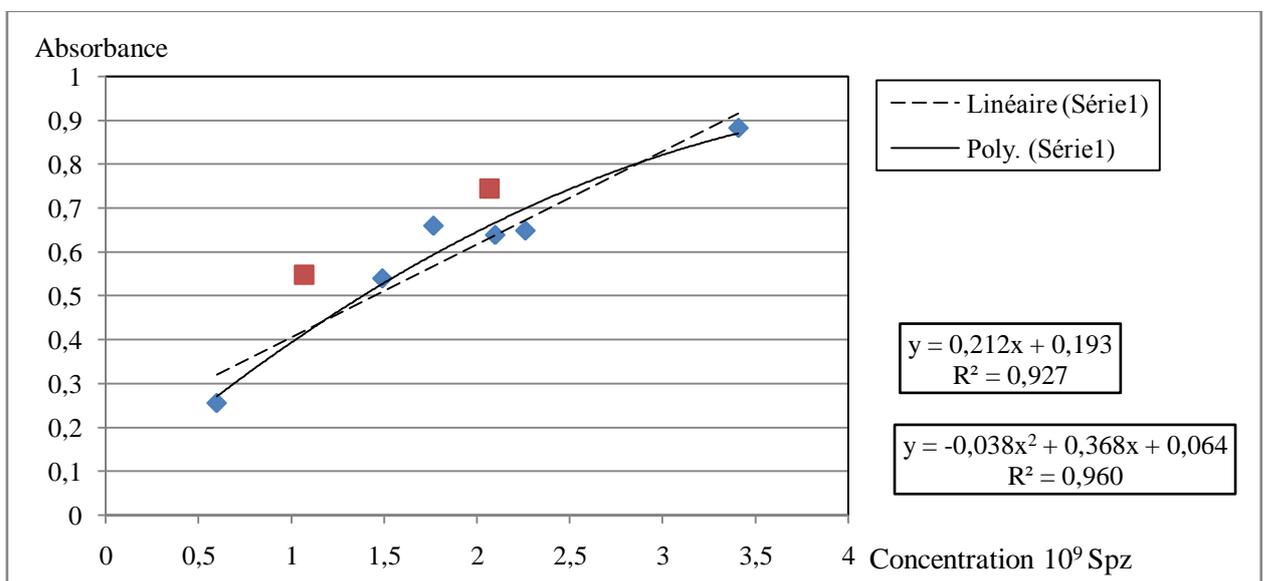


Figure n° 32: courbe de corrélation représentant l'étalonnage du spectrophotomètre pour le calcul de la concentration de la semence des dindons de 56 semaines d'âge après correction.

II.3.3. Courbe d'étalonnage du spectrophotomètre pour la semence des dindons de 56 et 28 semaines d'âge après correction

Sur la figure n° 33 on a représenté les valeurs des couples (absorbance ; concentration spermatique) ayant été retenues lors du calcul de la courbe d'étalonnage pour les échantillons des groupes des dindons âgés de 28 et 56 semaines. Tout de même, cette correction a nécessité une autre légère correction. Après cette 2^{ème} correction, on a obtenu un $R^2 = 0,9187$ soit le coefficient de corrélation $r = 0,96$. La formule sera donnée comme suit : $y = 0,00476x + 0,5416$.

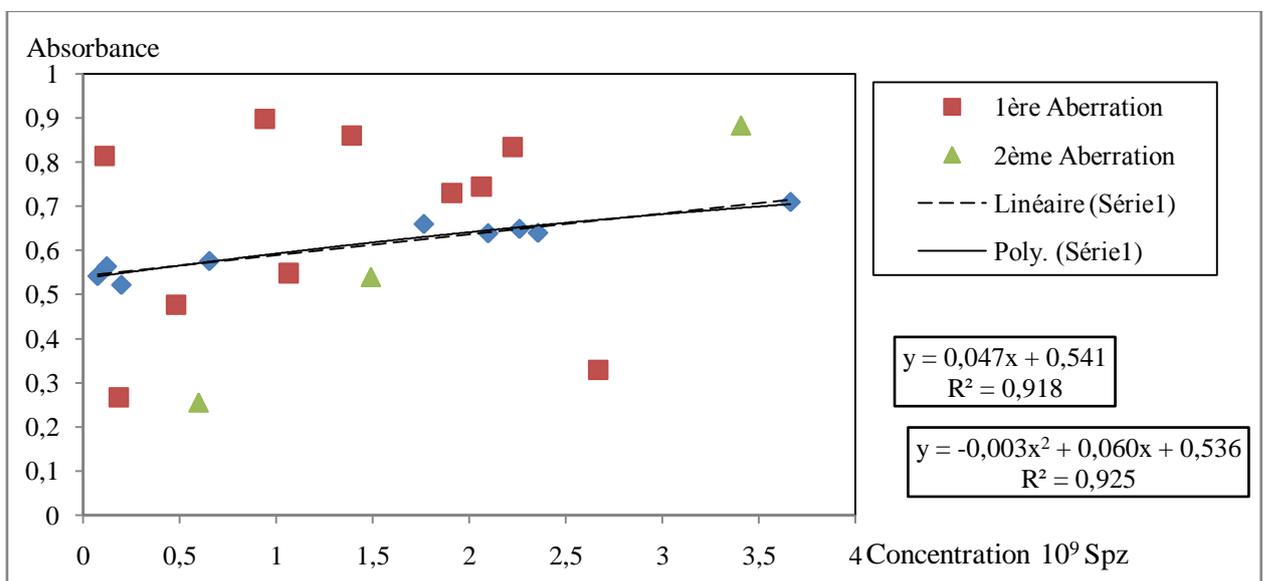


Figure n° 33 : courbe de corrélation représentant l'étalonnage du spectrophotomètre pour le calcul de la concentration de la semence Dinde après enlèvement des aberrations statistiques en fonction de l'âge et après une deuxième correction.

II.4. Choix de la formule

A la lumière de ces calculs, le choix de la formule qui représente plus intimement la corrélation linéaire entre la densité optique mesurée par le spectrophotomètre et la concentration spermatique de la semence de dinde, est à la faveur de la formule qui présente le coefficient de corrélation qui se rapproche de la valeur « 1 » et le plus élevé. Donc, on est à choisir entre :

1. $y = 0,1972x + 0,2515$ où $r = 0,92$.
2. $y = 0,046x + 0,5382$ où $r = 0,98$.
3. $y = 0,2121x + 0,1938$ où $r = 0,96$.
4. $y = 0,00476x + 0,5416$ où $r = 0,96$.

Il apparaît que la formule n°2 qui représente bien la relation entre l'absorbance et la concentration en spermatozoïdes de la semence de l'espèce dinde : **$y = 0,046x + 0,5382$**

Ainsi, si on cherche la concentration spermatique (x) donnée d'un éjaculat de dinde à partir d'une densité optique mesurée (y) :

$$x = \frac{y - 0,5382}{0,046}$$

Conclusion

Conclusion :

Au terme de notre travail, on conclue l'utilisation de spectrophotomètre est une méthode très efficace, précise, sensible et rapide par rapport à la lame de malassez quelle nécessite une préparation de l'échantillon et un comptage manuel sous le microscope d'où les erreurs sont possibles.

On a déterminé la formule de calcul avec une forte corrélation $r = 0.98$, néanmoins ce travail doit être effectué un plus grand nombre d'animaux et d'essayer de mettre un seul opérateur dans le comptage sur lame de malassez pour minimiser l'erreur lié au facteur humain et essayer d'étalonner ce travail sur différentes espèces à savoir cunicole, aviaire.

La liste des références

- ALBERT John, 2001.** : Utilisation du spectrophotomètre en biologie, Edition FLAMMARION 2001, page 366-390.
- AUDIGIE Claude et al, 1995** : Principes des méthodes d'analyse biochimique tome I, Editions DOIN, Pages 112-113.
- BALEDENT Françoise, 2000** : Biologiste, hôpital de Saint-Denis, France Développement et Santé, n°148, août 2000 /.
- BENAROUS K, 2006** : thème d'Ingénieur d'état en génie biologique Université Amar Telidji Laghouat Effets des extraits de quelques plantes médicinales locales sur les enzymes alpha amylase, trypsine et lipase
- BERNARD Serge 1985** : Biochimie clinique instrument et techniques de laboratoire diagnostics medico-chirurgicaux. Édition MALOINE.
- BURGOT Gwenola et BURGOT Jean – louis, 2006** : Méthodes instrumentales d'analyse chimique et applications. Edition LAVOISIER, 2006.
- Cahier de formation biologie médicale BIOFORMA, 2009.** Exploration de la fonction de reproduction. Versant masculin
- CARRIER R ,1971** : biochimie médicale principe généraux de l'analyse en biochimie médicale **notions élémentaires de méthodologie instrumentale.**
- CHARLOT G, 1978** : dosages absorptiométriques des éléments minéraux.
- COLES E.H, 1979** : le laboratoire en clinique vétérinaire, éditions VIGOT, page 53.
- EL MRABET Khadidja, 2001** : thèse de doctorat développement d'une méthode d'analyse de résidus de pesticides par dilution isotopique associée à la chromatographie en phase liquide couplée à la spectrophotométrie de masse en tandem dans les matrices cérébrales après extraction en solvant chaud pressurisé.
- HAINQUE Bernard BAUDIN Bruno LEFEBVRE Philippe 2008** : appareils et méthodes en biochimie et biologie moléculaire.
- Henkel James 1978:** Essentials of drug product quality,., the Mosby Company, page. 130,133
- JACQUES KRUH, 1982** : biochimie études médicales et biologiques I. biologie cellulaire et moléculaire, HERMANN COLLECTION, page 14, 15,16.

McNaught Allan et Wilkinson A, 1997. Compendium of Chemical Terminology.
Editeur : IUPAC International Union of Pure and Applied Chem; Édition : 2nd
Revised edition (11 août 1997).

MICHEL PRATS, 2002 : biochimie méthodes biophysiques expérimentales,
DUNOD,

RICHTERICH R, 1967 : chimie clinique théorique et pratique.

ROUESSAC Francis et al, 2009. : Analyse chimique ; Méthodes et techniques
instrumentales. Edition DUNOD. 2009.

Ruban G., Joannis C., Derrien A.-S : Evaluation de la précision des courbes
d'étalonnage des turbidimètres par la méthode de Monte Carlo Assessment of the
accuracy of turbidimeter calibration curves using the Monte Carlo method.

Webographie :

Cnrt.fr

fr.wikipedia.org/wiki/Dosage_colorim%C3%A9trique

fr.wiktionary.org/wiki/%C3%A9talonnage

journal officiel 1998 Recommandé en France par la DGLFLF, dernière
visite 13/03/2012

Wikimedia-english.

WisegEEK.com

www.ac-nancy-metz.fr/enseign/Physique/chim/jumber/HPLC/Chromatographie

www.aquoa.net/spip.php?article11

www.assistancescolaire.com/2000-2012, rue des écoles

www.assistancescolaire.com/2000-2012, rue des écoles

[www.lemonde.fr/revision-du-bac/annales-bac/chimie-terminale-s/courbe-
detallonnage_cxc85.html](http://www.lemonde.fr/revision-du-bac/annales-bac/chimie-terminale-s/courbe-detallonnage_cxc85.html)

[www.lemonde.fr/revision-du-bac/annales-bac/chimie-terminale-s/courbe-
detallonnage_cxc85.html](http://www.lemonde.fr/revision-du-bac/annales-bac/chimie-terminale-s/courbe-detallonnage_cxc85.html)

[www.lemonde.fr/revision-du-bac/annales-bac/chimie-terminale-s/courbe-
detallonnage_cxc85.html](http://www.lemonde.fr/revision-du-bac/annales-bac/chimie-terminale-s/courbe-detallonnage_cxc85.html)

www.maxicours.com/soutienscolaire/chimie/terminale-s/186315.html. PARIS
B432623429.

Résumé :

Pour évaluer la corrélation linéaire entre la densité optique mesurée par le spectrophotomètre et la concentration spermatique de la semence de dinde, on a pris deux échantillons de semence issue d'un élevage reproducteur dinde à Ain Oussama dans la wilaya de DJELFA, les animaux qui ont fait l'objet de cette récolte sont des dindons males de deux âges différents, 28 et 56 semaines. On a mesuré la densité optique par le spectrophotomètre (6705 spectrophotometer JANWAY®) à 540 nm puis on a estimé la concentration spermatique par la lame de malassez et on a procédé la courbe d'étalonnage.

Résultats : la présence de certaines aberrations statistiques dues à la manipulation mais après correction de cette courbe de corrélation on a obtenu la formule la plus plausible qui relie la densité optique et la concentration spermatique et qui est la suivante : $x = \frac{y-0,5382}{0,046}$

Où x est la concentration spermatique et y est la densité optique mesurée par le spectrophotomètre.

Mots clefs: semence, dinde.

Summary:

To estimate the linear correlation between optic densities measured by spectrophotometer and spermatic concentration of turkey semen, we have take two samples from reproductive cattle farming of turkey in Ain ouassara in DJELFA. The animals are male's turkey of different ages, 28 and 56 weeks. We have measured the optic densities by spectrophotometer (6705 spectrophotometer JANWAY®) at 540 nm, and then we have estimated the concentration spermatic by hemacytometer and we have proceeded a curve.

Result: we have found some aberrations caused by handling, but after the correction of this curve we have obtain the plausible formula that connect the optic densities and spermatic concentration that the following: $x = \frac{y-0,5382}{0,046}$

Where: x is optic densities. And y is spermatic concentration

Key words: semen, turkey.

ملخص

من أجل تقييم العلاقة الخطية بين الكثافة العينية المقاسة بمقياس الضوء الطيفي (السيكتروفوتومتر) و التركيز المنوي للسائل المنوي لحيوان الديك الرومي أخذنا عينتين من السائل المنوي لحيوان الديك الرومي من تربية الحيوانات الداجنة بمنطقة عين وسارة بولاية الجلفة , هذا السائل المنوي هو لحيوانات مختلفة العمر, أحدها 28 أسبوع و الآخر 56 أسبوع , لقد قسنا الكثافة العينية بمقياس الضوء الطيفي بطول موجة 540 نانومتر ثم قدرنا التركيز المنوي بواسطة صفيحة مالاسيز خلصنا الى رسم منحنى.

النتيجة لقد لاحظنا الى وجود خلل احصائي و لكن بعد تصحيحه وجدنا العلاقة القريبة من المعقول التي تربط العينية المقاسة و و التركيز المنوي و التي كالتالي

$$س = \frac{ع - 0,5382}{0,046}$$

كلمات مفتاح سائل منوي. الديك الرومي