

**REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE**

*الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية*

**MINISTER DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE**

*وزارة التعليم العالي و البحث العلمي*

**ECOLE NATIONALE SUPERIEUR VETERINAIRE – EL HARRACH –  
ALGER**

*المدرسة الوطنية العليا للبيطرة – الحراش – الجزائر*

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

**L'ETALONNAGE DU SPECTROPHOTOMETRE PAR CELLULE DE  
MALASSEZ DU SPERME EPIDIDYMAIRE DE L'ESPECE BOVINE ET  
OVINE**

**Réalisé par :**

**REBZANI MAYE  
RENNOU RIMA**

**Soutenu le : 11 juin 2015**

**Les jurys :**

**Présidente : Mm. SAADI H (MCA à l'ENSV)  
Examinatrice : Mm. ZANAD W (MAA à l'ENSV)  
Examineur : Mr. IDRES T (MAA à l'ENSV)  
Promoteur : Mr. BOUDJELLABA S (MAA à l'ENSV)**

**Année universitaire 2014/2015**

## **Remerciements**

*Nous souhaitons manifester nos sincères remerciements à :*

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

*On exprime notre profond remerciement et notre vive reconnaissance à Mr. BOUDJELLABA SOFIANE qui avait accepté d'encadrer et de diriger ce travail avec rigueur scientifique et pragmatisme .nous avons été fasciné par votre abord facile et votre simplicité, vos qualités scientifiques et humaines ainsi de ceux de Mr. IDRES TAKFARINES qui nous ont profondément marqué. Trouver ici l'assurance de notre profonde gratitude.*

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

*-Madame SAADI H, Professeur à L'ENSV ; Nous vous remercions de Vos qualités humaines et de femme de science suscitent respect et admiration. Soyez rassuré de notre sincère reconnaissance.*

*- Madame ZENNAD W, Professeur à L'ENSV ; Nous vous remercions de Votre rigueur d'homme de sciences et vos qualités humaines nous ont beaucoup marqué.*

*-Mr. IDRES , Professeur à L'ENSV ; Nous vous remercions de Votre aide dans vous nous avez fourni pondant la recherche pour aboutir à rédiger ce mémoire . Trouver ici notre sincère reconnaissance*

*A l'ensemble de la famille enseignante de l'ENSV pour nous avoir formés durant toutes ces années pour être à la hauteur et avoir toujours la volonté de continué notre chemin vers un meilleur avenir.*

*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.*

*Sans oublier bien sûr 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*

*Au nom de dieu le tout puissant et le très miséricordieux par la grâce de laquelle 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, Que Dieu vous protège et vous garde.*

*Ma sœur : Belkiss ;*

*Mon frère : Anes Maâmar ;*

*Parce que vous me faites rire, parce que je peux tout vous dire, pour ces millions de souvenirs, toujours présentes à mes côtés, Je ne vous le dis pas assez souvent, je vous aime.*

*A toute la famille : Rebzani*

*Ma collègue : Rennou Rima*

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

## Liste des figures

- Figure 01** : Représentation schématique de l'épididyme accolé au testicule
- Figure 02** : Image réelle de l'épididyme d'un taureau (a); représentation schématique d'un épididyme d'un taureau (b)
- Figure 03** : Vagin artificiel des ovins (a) et des bovins (b)
- Figure 04** : Récolte de la semence au vagin artificiel à l'aide d'un mannequin chez les bovins
- Figure 05** : Récolte de la semence au vagin artificiel à l'aide d'un bote en train chez les bovin
- Figure 06** : Récolte de la semence au moyen d'un vagin artificiel chez les ovins
- Figure 07** : Image correspondante a une sonde d'électro-éjaculation
- Figure 08** : Méthode de collecte au moyen d'un électro-éjaculateur chez les bovins
- Figure 09** : Méthode de récolte épидидymaire sur un testicule ovин
- Figure 100** : Domaine spectral du rayonnement électromagnétique.
- Figure 11** : Représentation du principe de la loi beer-lambert.
- Figure 12** : Schéma représentant le principe du fonctionnement du spectrophotomètre
- Figure 113** : Image représentant la lame de Malassez
- Figure 14** : Représentation du quadrillage de la lame de Malassez
- Figure 15** : Emplacement de la lamelle après humectation des berges
- Figure 16** : Schéma représentatif du dénombrement par rectangle.
- Figure17** : Schémas représentant le choix des rectangles dans le dénombrement
- Figure 128** : Courbe d'étalonnage représentant la concentration (C) en fonction de l'absorbance (A)
- Figure 139** : Récolte infructueuse d'une semence bovine (à gauche) et récolte de semence réussie (à droite)
- Figure 149** : Récolte infructueuse d'une semence bovine (à gauche) et récolte de semence réussie (à droite)
- Figure 21 (a)** : Courbe d'étalonnage du spectrophotomètre à la dilution de 1/100 avant la correction de la formule

**Figure 21 (b) :** Courbe d'étalonnage du spectrophotomètre à la dilution de 1/100 après la correction de la formule

**Figure 22 :** Courbe d'étalonnage du spectrophotomètre à la dilution de 1/200 avant la correction de la formule (a) et après correction (b)

**Figure 23 :** Courbe d'étalonnage du spectrophotomètre à la dilution de 1/400 avant la correction de la formule (a) et après correction (b)

**Figure 24 :** Courbe d'étalonnage du spectrophotomètre à la dilution de 1/600 avant la correction de la formule (a) et après correction (b)

**Figure 25 :** Courbe d'étalonnage du spectrophotomètre à la dilution de 1/800 avant la correction de la formule (a) et après correction (b)

**Figure 26 :** Courbe d'étalonnage du spectrophotomètre à la dilution de 1/1000 avant la correction de la formule (a) et après correction (b).

## **Liste des tableaux**

**Tableau 01** : Détermination de la note de la motilité massale de la semence

**Tableau 02** : Détermination de la note de la motilité individuelle des spermatozoïdes

**Tableau 03** : Tableau comparatif des différentes hématimètres

**Tableau 04** : Les volumes de sperme épидидymaire récoltés

**Tableau 05** : Différents systèmes de dilution

## **Liste des tableaux**

**Tableau 01** : Détermination de la note de la motilité massale de la semence

**Tableau 02** : Détermination de la note de la motilité individuelle des spermatozoïdes

**Tableau 03** : Tableau comparatif des différentes hématimètres

**Tableau 04** : Les volumes de sperme épидидymaire récoltés

**Tableau 05** : Différents systèmes de dilution

<b>Introduction.....</b>	<b>1</b>
<b>Partie bibliographique :</b>	
<b>CHAPITRE I : Propédeutique de l'appareil reproducteur et l'examen du sperme</b>	
<b>I. ANATOMIE DE L'APPAREIL GENITAL DU TAUREAU.....</b>	<b>2</b>
<b>I.1. Les testicules.....</b>	<b>2</b>
<b>I.1.2. Structure du testicule et du tube séminifère.....</b>	<b>2</b>
<b>I.2.Les voies spermatiques.....</b>	<b>3</b>
<b>I.3. Les voies uro-génitales.....</b>	<b>4</b>
<b>II. LA PRODUCTION DU SPERME.....</b>	<b>4</b>
<b>II.1.La spermatogenèse.....</b>	<b>4</b>
<b>II.2. La production du plasma séminal.....</b>	<b>5</b>
<b>III. TECHNOLOGIE DE LA SEMENCE.....</b>	<b>5</b>
<b>III.1. Récolte de la semence.....</b>	<b>5</b>
<b>III.1.1 Récolte au vagin artificiel.....</b>	<b>6</b>
<b>a) Taureau.....</b>	<b>6</b>
<b>b) Bélier.....</b>	<b>7</b>
<b>III.1.2. Récolte à l'électro-éjaculateur.....</b>	<b>7</b>
<b>a) Taureau.....</b>	<b>8</b>
<b>b) Bélier.....</b>	<b>8</b>
<b>III.1.3. Récolte épидидymaire.....</b>	<b>8</b>
<b>III.2. Evaluation de la qualité du sperme.....</b>	<b>9</b>
<b>III.2.1. Examens macroscopiques.....</b>	<b>9</b>
<b>III.2.1.1.Volume.....</b>	<b>9</b>
<b>III.2.1.2.Aspect, consistance et couleur.....</b>	<b>10</b>

III.2.1.3. Viscosité et Ph.....	10
III.2.2. Examens microscopiques.....	10
III.2.2.1. Motilité massale.....	10
III.2.2.2. Motilité individuelle.....	11
III.2.2.3. Concentration.....	11
III.2.2.4. Pourcentage des spermatozoïdes vivant et les anomalies morphologiques.....	11

## CHAPITRE II : Le spectrophotomètre

I. DEFINITION D'UN SPECTROPHOTOMETRE.....	13
II. ABSORBANCE D'UNE SUBSTANCE.....	13
❖ III. LOI D'ABSORPTION MOLECULAIRE : LOI DE BEER-LAMBERT....	14
❖ Conditions de validité de la loi Beer-Lambert.....	15
IV. PRINCIPE DU FONCTIONNEMENT DU SPECTROPHOTOMETRE....	15
V. DESCRIPTION DES ELEMENTS DE BASE D'UN SPECTROPHOTOMETRE.....	16
V.1. Source lumineuse.....	16
V.2. Monochromateur.....	16
V.3. Cuvette.....	16
V.4. Système de détection.....	17
VI. LES AVANTAGES D'UN SPECTROPHOTOMETRE.....	17
VII. LES INCONVENIENTS D'UN SPECTROPHOTOMETRE.....	17

## CHAPITRE III : La cellule de Malassez

I. DEFINITION.....	18
--------------------	----

<b>II. MATERIEL HEMATIMETRIQUE.....</b>	<b>18</b>
<b>II.1. Description de La cellule de Malassez.....</b>	<b>20</b>
<b>II.2. Caractéristiques de la chambre de la lame de Malassez.....</b>	<b>20</b>
<b>III. Manipulation.....</b>	<b>21</b>
<b>III.1. Remplissage de la cellule de numération.....</b>	<b>21</b>
<b>III.2. Numération.....</b>	<b>22</b>
<b>❖ Principe de comptage.....</b>	<b>22</b>
<b>III.3. Nettoyage après usage.....</b>	<b>24</b>
<b>CHAPITRE IV : L'étalonnage de sperme</b>	
<b>I. DEFINITION DE L'ETALONNAGE.....</b>	<b>25</b>
<b>II. PRINCIPE DE L'ETALONNAGE.....</b>	<b>25</b>
<b>III. REALISATION DE LA COURBE D'ETALONNAGE.....</b>	<b>26</b>
<b>IV. LES MODALITES DE L'ETALONNAGE.....</b>	<b>26</b>
<b>IV.1. Méthode d'étalonnage interne.....</b>	<b>26</b>
<b>IV.2. Méthode d'étalonnage externe.....</b>	<b>26</b>
<b>IV.3. Méthode des ajouts.....</b>	<b>27</b>
<b>V. LES DIFFERENTS TYPES D'ETALON.....</b>	<b>27</b>
<b>V.1. Etalon primaire.....</b>	<b>27</b>
<b>V.2. Etalon secondaire.....</b>	<b>28</b>
<b>VI. L'INCERTITUDE DE L'ETALONNAGE.....</b>	<b>28</b>
<b>Partie expérimentale :</b>	
<b>CHAPITRE I : Matériels et méthodes</b>	
<b>I.1. Matériels.....</b>	<b>30</b>

<b>I.1.1. Matériel animal.....</b>	<b>30</b>
<b>I.1.2. Matériels de collecte du sperme.....</b>	<b>31</b>
<b>I.1.3. Matériels d'évaluation de la concentration spermatique.....</b>	<b>31</b>
<b>I.1.4. Matériels de dilution du sperme (préparation de la semence).....</b>	<b>31</b>
<b>I.2. Méthodes.....</b>	<b>31</b>
<b>I.2.1. Collecte de la semence.....</b>	<b>31</b>
<b>I.2.2. Dilution de la semence.....</b>	<b>32</b>
<b>I.2.3. Comptage des spermatozoïdes par la Malassez.....</b>	<b>33</b>
<b>I.2.4. Mesures par spectrophotomètre.....</b>	<b>33</b>

## **CHAPITRE II : La courbe d'étalonnage**

<b>I. COURBE D'ETALONNAGE DU SPECTROPHOTOMETRE POUR LA DETERMINATION DE LA CONCENTRATION DE LA SEMENCE BOVINE ET OVINE.....</b>	<b>34</b>
<b>II.1. Courbe d'étalonnage du spectrophotomètre à la dilution 1/100.....</b>	<b>34</b>
<b>II.2. Courbe d'étalonnage du spectrophotomètre à la dilution 1/200.....</b>	<b>36</b>
<b>II.3. Courbe d'étalonnage du spectrophotomètre à la dilution 1/400.....</b>	<b>37</b>
<b>II.4. Courbe d'étalonnage du spectrophotomètre à la dilution 1/600.....</b>	<b>38</b>
<b>II.5. Courbe d'étalonnage du spectrophotomètre à la dilution 1/800.....</b>	<b>39</b>
<b>II.6. Courbe d'étalonnage du spectrophotomètre à la dilution 1/1000.....</b>	<b>40</b>
<b>Conclusion et recommandation.....</b>	<b>41</b>

# **INTRODUCTION**

**E**n Algérie, La forte demande en denrées animales (viandes et lait) incite l'introduction des biotechnologies de la reproduction dans les élevages bovins et ovins a savoir, l'insémination artificielle, le transfert embryonnaire et la fécondation *in-vitro*. Toutes ces techniques nécessitent une manipulation de la semence des mâles et une détermination le spermogramme quelque soit la méthode de récoltes (utilisation du vagin artificiel, l'électro-éjaculateur et le rinçage de l'épididyme). Un grand intérêt est accordé ces dernières années au sperme épидидymaire en vue de la commodité de récolte et la qualité de la cellule spermatique. On retient parmi les critères d'évaluation de la semence, la concentration. En effet, il existe plusieurs moyens de son estimation. On a l'utilisation d'un hématimètre sous microscope optique (exemple : la cellule de Malassez) et aussi l'utilisation du spectrophotomètre. Cette dernière nécessite au préalable de tracer une droite de corrélation entre les concentrations spermatiques des échantillons avec leurs absorbances obtenues par cet appareil, appelé aussi courbe d'étalonnage.

Ainsi, l'objectif de notre recherche était de déterminer la meilleure courbe d'étalonnage en fonction de la dilution appliquée pour les deux espèces (bovines et ovines) en même temps.

**PARTIE**  
**BIBLIOGRAPHIQUE**

# **CHAPITRE I**

## **Propédeutique de l'appareil reproducteur et l'examen du sperme**

## I. ANATOMIE DE L'APPAREIL GENITAL DU TAUREAU

L'appareil génital du taureau peut se décomposer en trois grandes parties :

- Les testicules ;
- Les voies spermatiques, incluant l'épididyme et le canal déférent ;
- Les voies uro-génitales, incluant l'urètre, les glandes annexes et le pénis. (BARONE R, 2001)

### I.1. Les testicules

Les testicules sont des organes pairs, ils assurent une double fonction : une fonction exocrine avec la production de spermatozoïdes ou spermatogénèse et une fonction endocrine avec la production des hormones mâles. Ils sont logés avec l'épididyme dans la tunique vaginale et le scrotum. (BARONE R, 2001)

#### ❖ Structure du testicule et du tube séminifère

Chaque testicule est entouré d'une capsule fibreuse, l'albuginée, et est cloisonné par des septums en lobules (voir figure 1). Chaque lobule contient 1 à 4 tubes séminifères dans lesquels a lieu la spermatogénèse. (BARONE R, 1990)

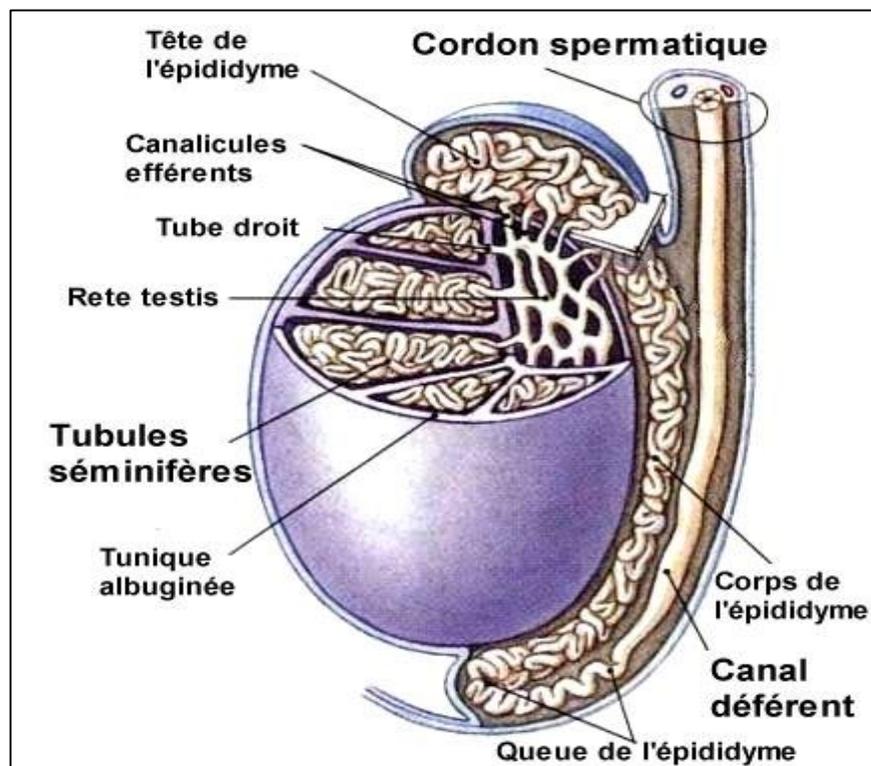


Figure 01 : Représentation schématique de l'épididyme accolé au testicule. (Grignard E, 2005)

La structure du tube séminifère comprend un épithélium séminal composé de cellules de Sertoli et de cellules germinales ainsi qu'un tissu de soutien, la lamina propria. (BARONE R, 1990)

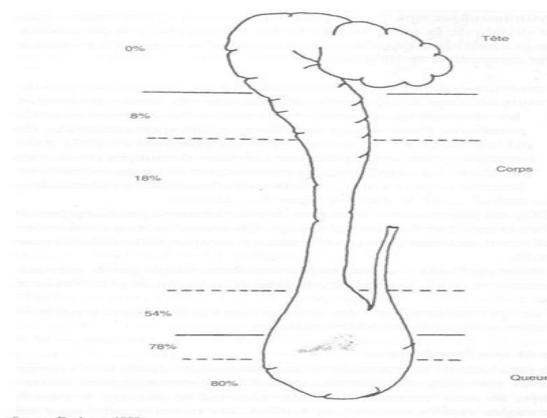
Au cours de la spermatogenèse, les cellules germinales migrent de manière centripète vers la lumière des tubules. Le liquide contenu dans cette lumière assure le transport des spermatozoïdes dans des structures tubulaires : les tubes droits puis le rete testis avant de rejoindre les canaux efférents et l'épididyme.

Les testicules sont irrigués par l'artère testiculaire, issue de l'aorte abdominale et innervés par des rameaux sensitifs et moteurs qui accompagnent l'artère testiculaire. (DADOUNE, 2001)

## I.2. Les voies spermatiques

A leur sortie du testicule, les spermatozoïdes ne sont pas matures : ils ne sont ni mobiles, ni féconds. La différenciation des spermatozoïdes appelée maturation s'effectue dans le conduit épидидymaire. Ce dernier joue plusieurs rôles essentiels pour la fertilité mâle. Il est impliqué dans le transport, la concentration, la maturation et le stockage des spermatozoïdes. (DACHEUX, 2001)

L'épididyme est constitué de trois parties : la tête, le corps et la queue. La tête couvre le testicule crânio-dorsalement. La continuité de la tête de l'épididyme avec le testicule est assurée par les conduits efférents. Le corps de l'épididyme longe le testicule médialement et la queue rejoint le conduit déférent. (BARONE R, 1990 et DACHEUX, 2001)



**Figure 02 : Image réelle de l'épididyme d'un taureau (a) (Source personnelle) ; représentation schématique d'un épидидyme d'un taureau (b) (DACHEUX, 1993)**

Alors que la tête et le corps épидидymaire sont responsables de la maturation spermatique, la queue est plus impliquée dans le stockage assurant qu'un nombre suffisant de gamètes soit présent à chaque éjaculation. La musculature de l'épididyme chasse les spermatozoïdes dans le conduit déférent pendant la phase préliminaire de l'éjaculation. (BARONE R, 1990)

### **I.3. Les voies uro-génitales**

L'urètre constitue la partie terminale des voies conduisant le sperme lors de l'éjaculation.

Le pénis du taureau est de type fibro-élastique s'avance très loin, sous le ventre et le prépuce et atteint le voisinage immédiat de l'ombilic. Il est incurvé en crochet vers la gauche. Les nerfs moteurs du pénis proviennent essentiellement de ramifications du nerf honteux. L'innervation autonome vient du plexus pelvien et suit le trajet des vaisseaux.

La palpation transrectale chez le taureau permet d'examiner ces glandes accessoires qui sont: les glandes vésiculaires ou vésicules séminales, la prostate et les glandes bulbo-urétrales. (BARONE, 1990)

## **II. La production du sperme**

Le sperme est un produit de sécrétion qui comprend les spermatozoïdes et le plasma séminal élaborés dans différentes parties du tractus génital. (DADOUNE et *al.*, 2001)

### **II.1. La spermatogenèse**

Débutant à la puberté, Ce processus de différenciation cellulaire aboutit à la production des spermatozoïdes à partir des spermatogonies souches. Cette production continue durant la vie de l'animal, nécessite la prolifération des spermatogonies souches par mitose. L'entrée des spermatogonies souches dans le processus de spermatogenèse ou cycle séminal se fait à intervalles réguliers de 13,5 jours chez le taureau. La méiose est l'étape de brassage génétique permettant la formation de cellules haploïdes : les spermatides, à partir des spermatogonies (diploïdes).

La spermiogenèse est l'étape de différenciation cytoplasmique qui permet la formation de cellules mobiles (les spermatozoïdes) à partir de cellules rondes et immobiles (les spermatides). Cette étape correspond à de nombreux remaniements cytoplasmiques et à la condensation de la chromatine. (DADOUNE et *al.*, 2001)

La durée de la spermatogenèse est d'environ 54 jours chez le taureau. La durée moyenne de transit dans l'épididyme est de 8 jours (HOCHEREAU et *al.*, 1964). Cela signifie que les spermatozoïdes que l'on retrouve dans un éjaculat ont été fabriqués dans les testicules lors de la spermatogenèse deux mois plus tôt environ.

## **II.2. La production du plasma séminal**

Les principales fonctions du plasma séminal sont hydrodynamiques et énergétiques. Celui-ci étant essentiellement constitué d'eau, il doit permettre le déplacement et la survie des spermatozoïdes dans le tractus génital de la femelle après l'éjaculation (KNOBIL et *al.*, 1988). Les sécrétions des glandes annexes constituent la majeure partie de la fraction liquide de l'éjaculat, de 50 à 95% du volume total du plasma séminal suivant les espèces. (DACHEUX, 2001)

Les vésicules séminales sont les principales glandes annexes à l'origine de la sécrétion particulièrement élevée de fructose dans le plasma séminal du taureau et du bélier, elles produisent également de l'inositol qui a un rôle méconnu et de l'acide citrique en quantité importante qui est aussi un substrat énergétique des spermatozoïdes.

La prostate sécrète un liquide riche en élément minéraux, zinc principalement puis calcium, magnésium et potassium, comme elle contient aussi de nombreuses protéines, le pH du liquide prostatique est acide, il contient de l'acide citrique et une protéine spécifique : la spermine.

Le principal composant de la sécrétion des glandes bulbo-urétrales est la sialomucine qui est responsable de la gélification de la semence après son émission. (DACHEUX ,2001 et KNOBIL et *al.*, 1988)

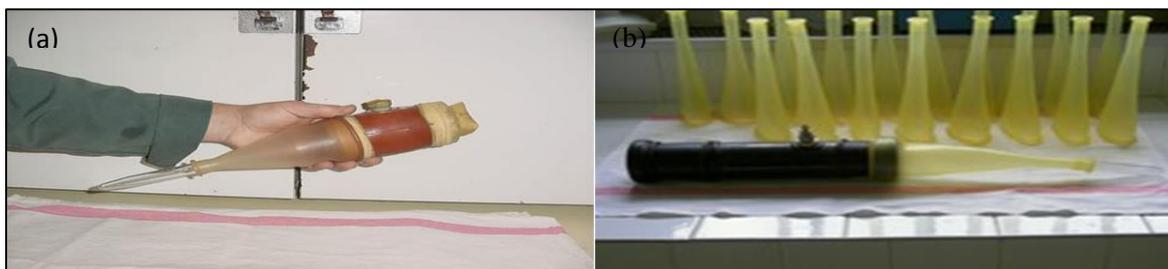
## **III. Technologie de la semence**

### **III.1. Récolte de la semence**

La récolte du sperme est un procédé qui peut se faire soit en ante-mortem (animal vivant) ou en post-mortem (après castration ou abattage). La première est une opération faite soit à l'aide d'un vagin artificiel ou d'un l'électro éjaculateur (BARIL G et *al.*, 1993) , tandis que la deuxième est fait à partir de la queue de l'épididyme. (DACHEUX et *al.*, 2003)

### III.1.1 Récolte au vagin artificiel

Un vagin artificiel permet de récolter la semence dans des conditions optimales de température, de pression et de lubrification du vagin.



**Figure 03 : Vagin artificiel des ovins (a) ([insemovin.pagesperso-orange.fr](http://insemovin.pagesperso-orange.fr)) et des bovins (b) ([jura-betail.fr](http://jura-betail.fr))**

#### a) Taureau

Avant chaque utilisation, maintenir si possible le vagin dans une étuve à 45°C puis le faire sortir au dernier moment, lorsque le préleveur estime que le taureau est suffisamment préparé, le remplir avec de l'eau pour permettre de maintenir une certaine pression et une température du vagin d'environ 42°C. L'intérieur du vagin est alors lubrifié avec de la vaseline ou un gel gynécologique.

Le taureau monte alors sur le bœuf en train. Le préleveur s'accroche au taureau, il dévie son pénis en érection dans le vagin artificiel, l'éjaculation ne dure que quelques secondes. L'opérateur retourne ensuite le vagin artificiel et le sperme s'écoule dans le tube collecteur. (DUMONT, 1997)



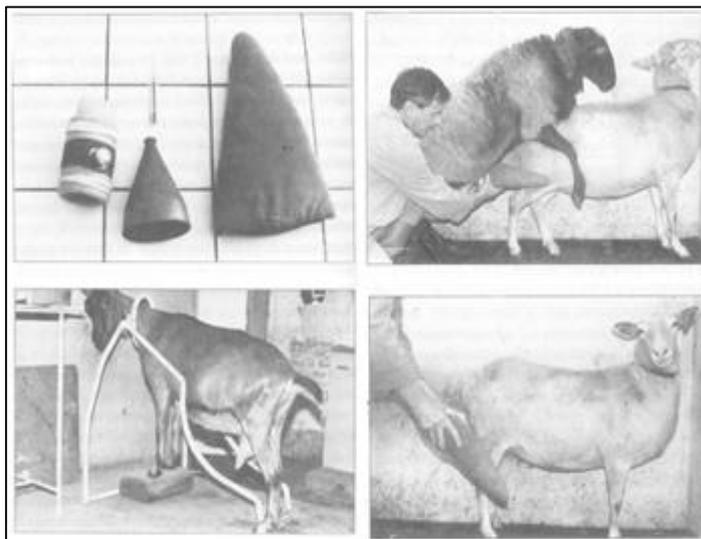
**Figure 05 : Récolte de la semence au vagin artificiel à l'aide d'un mannequin chez les bovins (journal : [lagruyere.ch](http://lagruyere.ch), 2014histoire-de-stars-et-de-paillettes)**



**Figure 04 : Récolte de la semence au vagin artificiel à l'aide d'un bœuf en train chez les bovins (terre-net media.fr)**

**b) Bélier**

Le type de vagin artificiel est comparable à celui utilisé chez le taureau mais de dimensions plus réduites. Sa température doit se situer entre 41 et 44°C. L'animal de monte peut être une brebis en chaleurs ou bien un bélier ou une brebis traitée aux œstrogènes. Les béliers peuvent être entraînés à donner du sperme en-dehors de la période de reproduction proprement dite. (BARIL G *et al.*, 1993)



**Figure 06 : Récolte de la semence au moyen d'un vagin artificiel chez les ovins (BARIL G *et al.*, 1993)**

**III.1.2. Récolte à l'électro-éjaculateur**

L'électro-éjaculation consiste à provoquer l'émission de sperme par l'excitation électrique des nerfs érecteurs et éjaculateurs. Elle est réalisée sur animal debout ou couché. L'appareillage comporte une sonde rectale de forme ogivale munie d'électrodes bipolaires parcourues d'un courant d'intensité moyenne mais de bas voltage et une tension constante. (RIGAL F., B., G., 2008)



**Figure 07 : Image correspondante à une sonde d'électro-éjaculation (ELMORE R.G, 1996)**

**a) Taureau**

L'animal est placé dans une cage de contention. L'extrémité du fourreau sera nettoyée et ses poils coupés. Une palpation manuelle du rectum permet de le débarrasser de ses matières fécales. Un drainage du rectum au moyen de 2 à 3 litres d'eau salée facilite l'évacuation du rectum et augmente le contact entre l'électrode et la paroi rectale. La sonde est lubrifiée au moyen de vaseline et progressivement introduite dans le rectum. Le sperme est collecté au moyen d'une éprouvette placée au bout d'un entonnoir fixé à un manche. (HANZEN CH, 2009-2010)



**Figure 08 : Méthode de collecte au moyen d'un électro-éjaculateur chez les bovins (ELMORE R.G, 1996)**

**b) Bélier**

Le bélier répond très bien et plus rapidement que le taureau à la méthode de collecte par électro-éjaculation. Le pénis et son appendice terminal filiforme sont extériorisés et introduits dans le tube de récolte avant que l'éjaculation ne survienne qui en général apparaît au bout de trois à quatre stimulations de 2 à 8 volts. (HANZEN CH, 2009-2010)

### III.1.3. Récolte épидidymaire

La récolte est faite au niveau de la partie caudal de l'épididyme; Le contenu de la lumière du tubule épидidymaire est recueilli en perfusant de l'huile de paraffine dans le canal déférent à l'aide d'une aiguille maintenue par un clamp. Le sperme est collecté dans une épipondorf en incisant l'organe au niveau de la moitié de la région caudale. (GUÉRIN Y et *al.*, 2003)



**Figure 09 : Méthode de récolte épидidymaire sur un testicule ovin (GUÉRIN Y et *al.*, 2003)**

### III.2. Evaluation de la qualité du sperme

Classiquement, un prélèvement préalable du sperme conditionne la détermination de sa qualité, cette évaluation prend appuis sur divers examens macroscopiques et microscopiques. (BARIL G et *al.*, 1993)

#### III.2.1. Examens macroscopiques

C'est un examen général qui se fait directement par observation de l'éjaculat dans le tube gradué qui a servie à la collecte pour exclure les caractéristiques suivante :

##### III.2.1.1. Volume

La quantité de sperme varie selon les espèces et pour une espèce donnée, selon l'état physiologique de l'individu, l'âge, la saison, les méthodes de récolte, la race ou encore les conditions sanitaires et alimentaires. (EZEKWE A.G, 1988)

### III.2.1.2. Aspect, consistance et couleur

L'aspect est généralement homogène et crémeux (DJABAKOU *et al.*, 1984). Le sperme du taureau est de consistance laiteuse et de coloration blanchâtre alors que celui du bélier est blanc crémeux, plus dense et plus opaque. (BARIL G *et al.*, 1993)

### III.2.1.3. Viscosité et pH

La viscosité dépend de la concentration en spermatozoïdes. Comparée à l'eau distillée, tandis que la mesure du pH faite au pH-mètre doit être immédiate, le sperme s'acidifiant rapidement étant donné la formation d'acide lactique. Sa valeur normale doit être comprise entre 6.5 et 6.8. D'une manière générale, les spermatozoïdes forts concentrés et riches en fructose accusent une diminution plus rapide du pH que les autres du fait de l'accumulation plus rapide d'acide lactique due à une glycolyse plus intense ce qui indirectement témoigne leur meilleure qualité. (EZEKWE A.G, 1988 et BARIL G *et al.*, 1993)

## III.2.2. Examens microscopiques

Comme son nom l'indique, cet examen fait principalement appel au microscope, il comporte :

### III.2.2.1. Motilité massale

La progression des spermatozoïdes est habituellement rectiligne. Au cours de leur déplacement, ils subissent une rotation autour de leur grand axe. L'intensité et le nombre des mouvements se traduisent par de véritables vagues observables après dépôt d'une goutte de sperme pur sur une lame et placé sur platine chauffante du microscope 37-38°C sous grossissement de 80, l'observation doit être faite très rapidement car la motilité massale du sperme pur diminue rapidement au bout de 15 à 20 secondes. La mesure est faite en utilisant une échelle qui va de 0 à 5 ainsi que cela est défini dans le tableau suivant (BARIL *et al.*, 1993) :

**Tableau 01 : Détermination de la note de la motilité massale de la semence**

Note	Aspect du mouvement
0	Immobilité totale
1	Mouvement individualisés
2	Mouvement très lent
3	Motilité massale générale de faible amplitude
4	Motilité massale rapide, sans tourbillon
5	Motilité massale rapide, avec tourbillon

### III.2.2.2. Motilité individuelle

Réalisée dans les mêmes conditions que pour la motilité massale. La mesure est faite en utilisant une échelle qui va de 0 à 5, cette estimation doit tenir compte de la vitesse de déplacement de spermatozoïde et de ses mouvement latéraux comme il est indiqué dans le tableau suivant (BARIL G *et al.*, 1993) :

**Tableau 02 : Détermination de la note de la motilité individuelle des spermatozoïdes**

Note	Aspect du mouvement
0	Pas de déplacement des spz
1	Déplacement très lent ou pas de déplacement, tremblements du spz, oscillations de la queue
2	Déplacement lent, tremblements, mouvements inorganisés, quelques spz se déplacent plus rapidement
3	Les spz effectuent des mouvements curvilinéaires, sans tremblement
4	Déplacement rapide, quelques spz avec une trajectoire rectiligne, d'autres avec une trajectoire courbe
5	Déplacement rectiligne et rapide des spz

### III.2.2.3. Concentration

La concentration détermine le nombre de spermatozoïdes par  $\text{mm}^3$  (ou par ml). Elle peut être déterminée directement par comptage des spermatozoïdes au moyen d'une cellule hématimétrique ou indirectement par comparaison visuelle du sperme à des solutions standard ou par comptage électronique. On peut apprécier la concentration des spermatozoïdes en évaluant l'opacité de la suspension au moyen d'un Spectrophotomètre. Cette opacité peut cependant être indirectement augmentée suite à la présence de débris cellulaires. (EZEKWE A.G, 1988 et BARIL G *et al.*, 1993)

### III.2.2.4. Pourcentage des spermatozoïdes vivant et les anomalies morphologiques

Ce test utilise le colorant éosine/nigrosine pour la préparation du frottis de semence, ainsi tout spermatozoïde coloré en rouge ou en rose est considéré comme mort, ce nombre est utilisé pour le calcul du pourcentage de spermatozoïdes morts/vivants.

Les spermatozoïdes anormaux peuvent être repartis en différentes classes :

- Spz sans queue ;
- Spz avec anomalie au niveau de la tête (acrosome anormal, tête petite ou étroite, tête élargie en forme de poire, ect....) ;
- Spz avec anomalie au niveau du flagelle ;
- Spz avec gouttelettes cytoplasmique proximal ;
- Spz avec gouttelettes cytoplasmique distal.

Un examen régulier de la semence permet la détection d'anomalies inattendues ou de découvrir qu'un reproducteur a subi des dommages spermatique. En effet les spermatozoïdes subissent rapidement des altérations en cas d'infection même très localisées. (BARIL G et *al.*,1993)

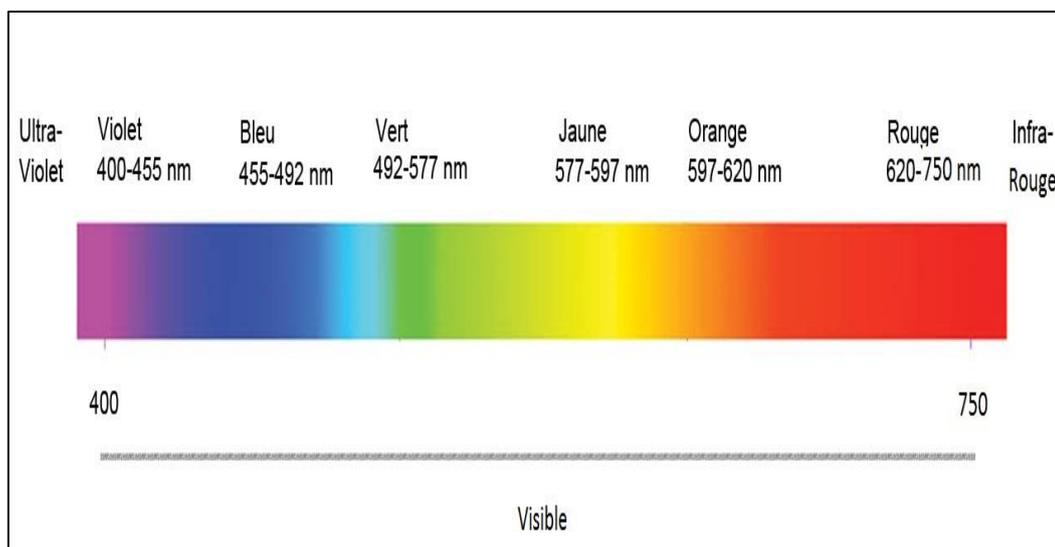
# **CHAPITRE II**

## **Le spectrophotomètre**

## I. DEFINITION D'UN SPECTROPHOTOMETRE

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

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



**Figure 10 : Domaine spectral du rayonnement électromagnétique (image adaptée et retouchée)**

## II. ABSORBANCE D'UNE SUBSTANCE

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

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

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

### III. LOI D'ABSORPTION MOLECULAIRE : LOI DE BEER-LAMBERT

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

$$A = \log (I_0 / I)$$

On parle aussi de transmittance définie par la relation :

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

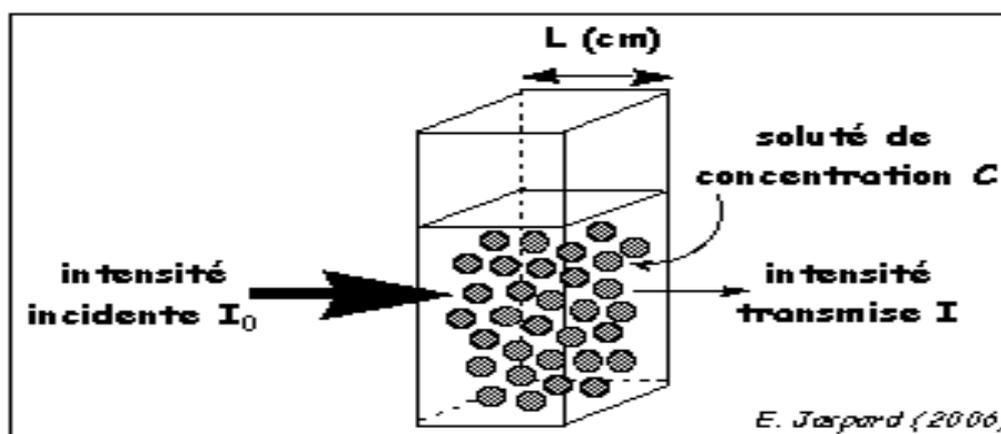


Figure 11 : Représentation du principe de la loi Beer-Lambert.

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

La relation de Beer-Lambert décrit qu'à la longueur d'onde  $\lambda$  donnée, l'absorbance d'une solution est proportionnelle à sa concentration et à la longueur du trajet optique (Distance sur laquelle la lumière traverse la solution).

Alors, pour une solution limpide contenant une seule substance absorbante :

$$A_\lambda = \epsilon_\lambda \cdot L \cdot C$$

- $A_\lambda$  est l'absorbance de la solution pour une longueur d'onde  $\lambda$ .
- $C$  (en  $\text{mol.L}^{-1}$ ) est la concentration de la substance absorbante.
- $L$  (en cm) est la longueur du trajet optique.
- $\epsilon_\lambda$  (en  $\text{L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ ) est le coefficient d'absorbance (anciennement coefficient d'extinction molaire). C'est une caractéristique de la substance étudiée à une longueur d'onde donnée. (HENKEL J, 1978)

### ❖ Conditions de validité de la loi Beer-Lambert

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

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

## IV. PRINCIPE DU FONCTIONNEMENT DU SPECTROPHOTOMETRE

Le spectrophotomètre est un appareil équipé d'un dispositif analysant le rayonnement. Tous les composants optiques (lentilles, miroirs, cellules, dispositifs de dispersion) doivent être transparents dans la gamme spectrale employée.

Le spectrophotomètre est composé de :

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

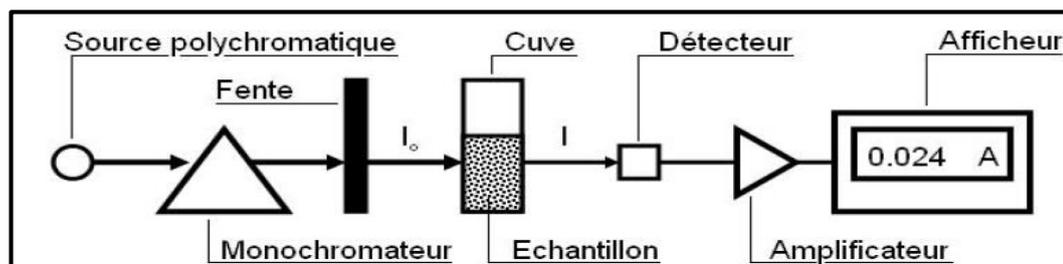


Figure 12: Schéma représentant le principe du fonctionnement du spectrophotomètre (DEWEERDT L ET AL 2009)

## V. DESCRIPTION DES ELEMENTS DE BASE D'UN SPECTROPHOTOMETRE

Le spectrophotomètre est un appareil qui comporte plusieurs éléments de base nécessaire pour son fonctionnement.

### V.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 qui sont : la lampe de tungstène et lampe à hydrogène ou au deutérium. (ROUESSAC F et ROUESSAC A, 2009)

### V.2. Monochromateur

C'est un système qui équipe les spectrophotomètres et qui permet de sélectionner toutes les longueurs d'onde du spectre.

Un monochromateur est constitué de :

- Fente d'entrée de la lumière blanche ;
- Système de dispersion : permet de décomposer la lumière blanche. Il s'agit de prisme ou de réseau obtenu grâce à une nouvelle technologie laser ;
- Fente de sortie pour sélectionner la longueur d'onde.(BURGOT G ET BURGOT J, 2006

### V.3. Cuvette

Elle contient soit l'échantillon soit la référence. Elle existe sous différents types, généralement en plastique (spectre visible, UV proche) ou en quartz (UV, mais cuvettes très chères) (HENKEL J, 1978). Toutefois, il existe certaines précautions d'usage à respecter :

- ✓ Choisir le type de cuve adaptée à la longueur d'onde :
  - Cuves en quartz pour les ultra-violets (190 nm - 400 nm) ;
  - Cuves en verre ou polystyrène pour le visible (400 nm - 800 nm) ;
  - Cuves en matières plastiques : cuves à usage unique, spectre limité allant de 320 à 900 nm ;
  - Cuves en verre : plus fragiles et plus coûteuses.
- ✓ Ne jamais mettre les doigts sur les faces dépolies des cuves.
- ✓ Bien orienter la cuve par rapport à l'axe du faisceau lumineux.
- ✓ Supprimer toutes les bulles d'air.

#### V.4. Système de détection

C'est un détecteur électronique dont la réponse est proportionnelle à un courant électrique et permet une mesure relative de l'intensité lumineuse c'est-à-dire convertir les impacts photoniques en impulsions électriques qui seront ensuite traitées. (HENKEL J ,1978)

### VI. LES AVANTAGES D'UN SPECTROPHOTOMETRE

Le spectrophotomètre présente plusieurs avantages :

- Méthode facile à mettre en œuvre.
- Simplicité et rapidité des mesures.
- Un large domaine d'application : permet de tester l'effet de divers paramètres (concentration de molécules, pH, température, ...).
- Appareillage parmi les moins "onéreux".
- Pas de risque de contamination.
- Spécificité spectrale.
- Bonne précision de la mesure d'absorbance (à un millième près).

### VII. LES INCONVENIENTS D'UN SPECTROPHOTOMETRE

Comme le spectrophotomètre a plusieurs avantages, il existe aussi certains inconvénients :

- Lors d'une mauvaise dilution (forte concentration), le spectrophotomètre ne compte pas les spermatozoïdes en plus.
- Le spectrophotomètre ne différencie pas entre les spermatozoïdes et les autres cellules.
- Du fait qu'il est très sensible nécessitant ainsi un entretien soutenu pour le bon fonctionnement et la durée de vie de l'appareil.

# **CHAPITRE III**

## **La cellule de Malassez**

## I. DEFINITION

L'hématimètre est une cellule de verre calibrée, permettant la numération globulaire de différents liquides biologiques tel que le sang, les urines, le liquide céphalorachidien ....etc. La concentration ainsi obtenue est exprimée en nombre de cellule par millilitre. La numération cellulaire est réalisée directement par comptage au microscope optique (BALEDENT F, 2000)

Il existe différents types de cellules de comptage ; ces cellules qui diffèrent par leurs quadrillages permettent toutes de dénombrer dans un volume précis et connu tous les éléments visibles à l'objectif 40. (CUZIAT J et *al.*, JUIN 2011)

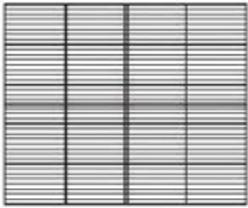
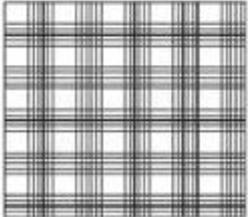
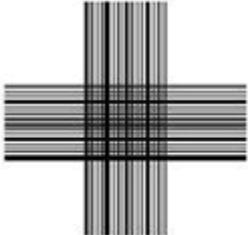
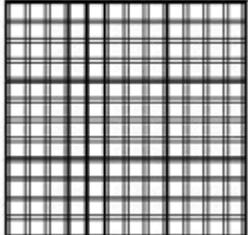
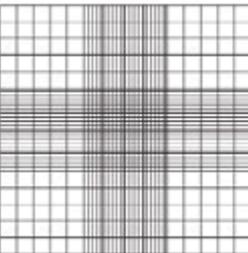
En fait, le choix de la cellule dépend en réalité de l'habitude de l'opérateur (BALEDENT F., 2000) et la disponibilité de la cellule de comptage dans le marché. Effectivement, dans le domaine de l'insémination artificielle bovine, plusieurs centres préfèrent une cellule à une autre (par exemple : la cellule de Thoma par rapport à la cellule de Malassez).

## II. MATERIEL HEMATIMETRIQUE :

Le matériel hématimétrique nécessaire pour effectuer le comptage cellulaire est composé de :

1. Cellule de comptage Hématimètre (voir tableau n° 3) ;
2. Lamelle plane ;
3. Pipette Pasteur ou micropipette ;
4. Liquide de dilution ;
5. Un microscope optique. (COLES E.H, 1979)

Tableau n° 3 : tableau comparatif des différents hématimètres

Nom de la cellule	Utilisation	Quadrillage de la lame
Cellule de NAGEOTTE	-LCR. « liquide de faible densité cellulaire »	
Cellule de LEMAUR	-Cytologie urinaire. « liquide de faible densité cellulaire »	
Cellules de MALLASSEZ	-Numération des hématies, -Numération des leucocytes, -Numération des t spermatozoïdes.	
Cellule de THOMA	-Numération des hématies, -Numération des leucocytes.	
Cellule de BURKER	-Numération des hématies, -Numération des leucocytes.	
Cellule de NEUBAUER	-Numération des hématies, -Numération des leucocytes. « liquides à forte densité cellulaire »	
Cellule de MAKLER	Dénombrement et détermination de la mobilité des spermatozoïdes à partir de photomicrographie de spermatozoïdes vivants.	

## II.1. Description de La cellule de Malassez

Selon le procédé de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS 1992), la Malassez appelée également la chambre de comptage sert au dénombrement aussi bien des hématies que des spermatozoïdes. (KHERADMAND A *et al.*, 2006)

L'hématimètre le plus couramment utilisé est fait d'une seule pièce de verre portant deux surélévations. (COLES E.H, 1979). La cellule de Malassez est constituée de deux chambres, chacune d'elles comporte un quadrillage gravé sous forme de traces dont les dimensions sont définies. (CUZIAT J *et al.*, JUIN 2011)

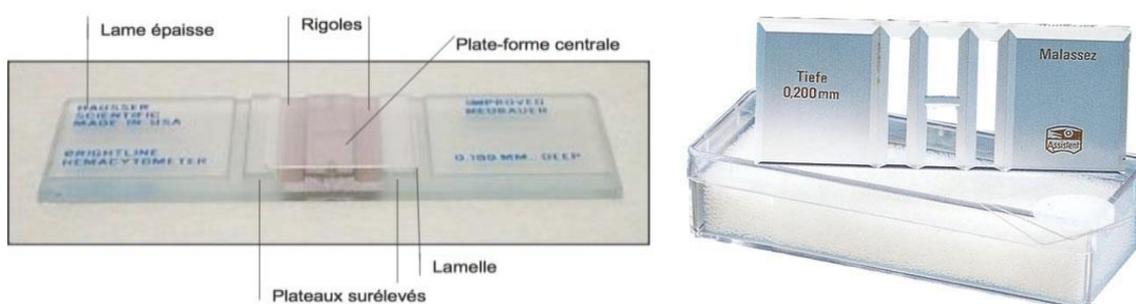
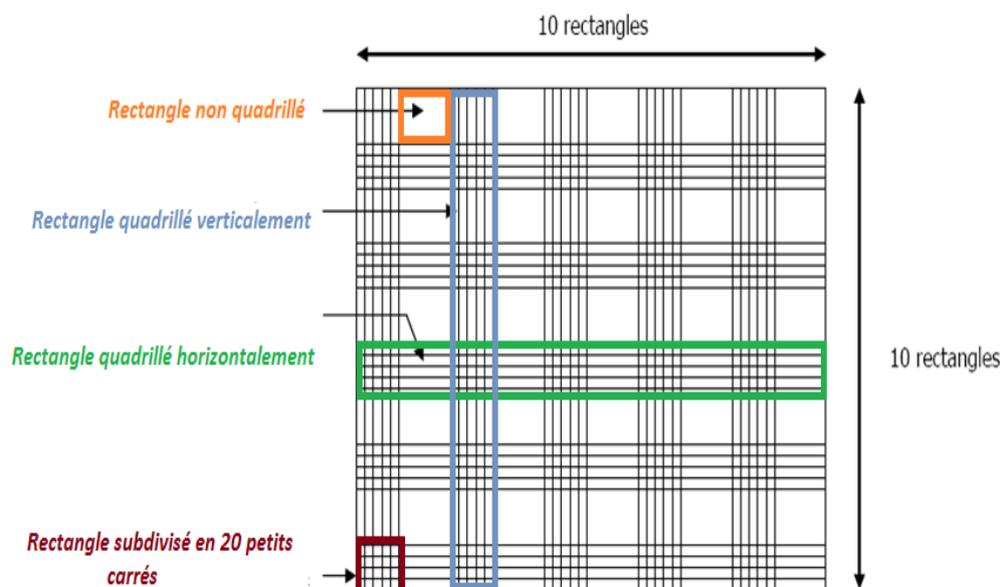


Figure 13 : image représentant la lame de Malassez (Wikipédia)

## II.2. Caractéristiques de la chambre de la lame de Malassez

- Une cellule Malassez est composée de deux chambres séparées par une fente, chacune de ces chambres possède un quadrillage spécifique comportant 100 rectangles totaux dont 10 bandes verticales et 10 bandes horizontales.
- La bande longue de 0,25 mm, large de 0,2 mm et profonde de 0,20 mm dont le volume est de  $1/10\text{mm}^3$ , est subdivisée dans sa largeur en intervalles égaux (cinq intervalles pour la bande verticale et quatre pour la bande horizontale), formant au total 25 rectangles quadrillés en 20 petits carrés et 25 non quadrillés d'où on conclue que le volume total de la chambre est d'un  $\text{mm}^3(100*0,25*0,2*0,2 = 1\text{mm}^3)$ . (BONNEFOY C *et al.*, 2002)



**Figure 14 : Représentation du quadrillage de la lame de Malassez (image adapté et retouchée)**

### III. MANIPULATIONS

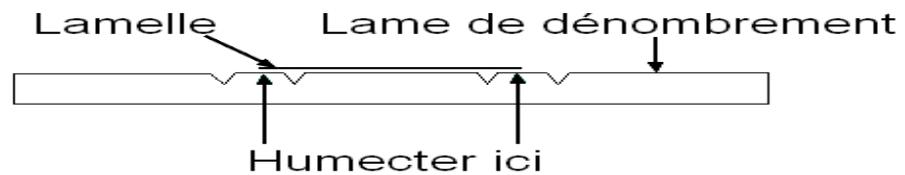
La numération suppose la dilution préalable du sperme dans une solution susceptible de disperser et de tuer les spermatozoïdes : solution de chlorure de sodium à 3 % ou solution de formaldéhyde à 1 %.(HANZEN CH, 2009-2010). Cette dilution est aussi faite dans le but de faciliter le comptage dans la Malassez. Cependant, elle est variable et ne doit être dans aucun cas oubliée lors de calcul final. (BALEDENT F, 2000)

#### III.1. Remplissage de la cellule de numération

Le remplissage de la Malassez se fait comme suit :

1. Humecter les berges de la cellule« ou rigoles » avec un petit chiffon humide propre et essoré, certain auteurs disent qu'on peut utiliser de la salive mais sa reste une méthode de dernière intention en raison de la possibilité de contamination de la semence.
2. Faire glisser la lamelle rodée sur ces berges en assurant son adhésion par pression des deux pouces.
3. Poser la cellule sur une surface bien horizontale.
4. Homogénéiser la suspension cellulaire à analyser.
5. Prélever la suspension à l'aide d'une micropipette.

6. Remplir la chambre de comptage par capillarité, en plaçant la pointe de la pipette légèrement inclinée près de la lamelle sur la plate-forme centrale quadrillée (le remplissage doit être fait en une seule fois, sans bulles d'air et sans faire déborder le liquide dans les rigoles).
7. Poser l'hématimètre à plat sur la pailleasse dans une chambre humide (Attendre au moins 5-10 minutes avant d'entreprendre le comptage pour permettre la sédimentation des cellules).
8. Placer sous microscope et faire la mise au point pour la numération.(COLES E.H, 2000)



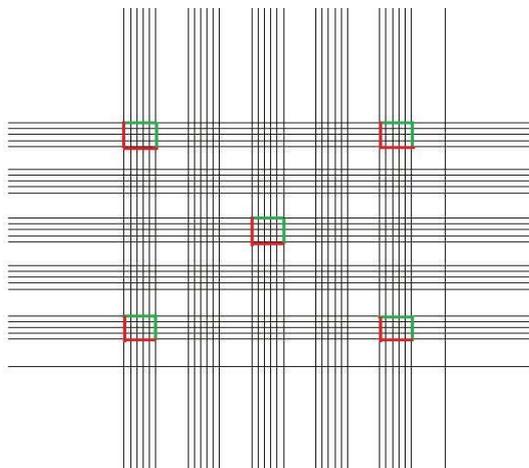
**Figure 15 : emplacement de la lamelle après humectation des berges (Wikipédia)**

### III.2.Numération

#### ❖ Principe de comptage

- Avant de faire le comptage :
  - Objectif  $\times 10$  ou  $20$  pour avoir une vue d'ensemble du quadrillage ; Vérifier la répartition homogène des cellules car si elle est hétérogène il faut recommencer la mise en cellule.
  - Repérer un rectangle de Malassez et passer à l'objectif  $\times 40$  (mise au point) pour effectuer le comptage.
  - La lame est balayée de façon méthodique de gauche à droite et de haut en bas.
- Réalisation du comptage :
  - Pour obtenir une numération proche de la réalité il est important de :
    - Ne pas rayer le quadrillage lors du nettoyage de la cellule.
    - Bien monter la lamelle sur la cellule.
    - Déposer la goutte de l'échantillon correctement.
    - Bien laisser sédimenter les particules à énumérer avant le comptage. (CUZIAT J et *al.*, JUIN 2011)

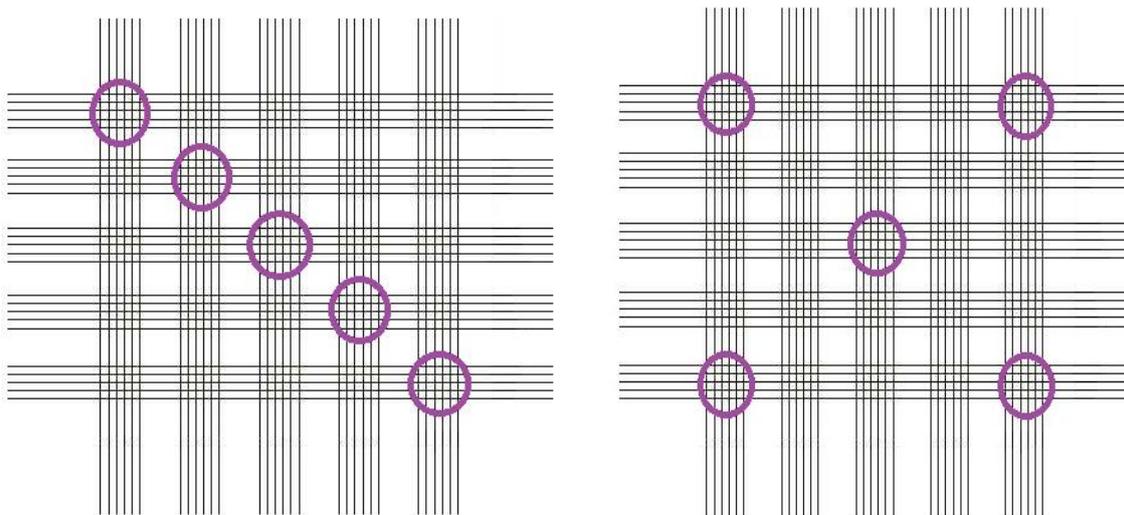
En pratique, pour les cellules chevauchant les lignes de quadrillage, il est convenu de ne tenir compte que des cellules positionnées sur les côtés droits et supérieurs. (BALEDENT F, 2000)



**Figure 16 : schéma représentatif du dénombrement par rectangle (image adapté et retouchée)**

- Afin de faciliter le travail, il est admis de compter dans 5 rectangles au lieu de 25; L'opérateur doit choisir une des deux méthodes de choix pour faciliter le dénombrement et éviter les erreurs lors du comptage :

1. Soit on choisit de prendre les 4 rectangles de coins et un central,
2. Soit on choisit les 5 rectangles de la diagonale.



**Figure 17 : schéma représentant le choix des rectangles dans le dénombrement (image adaptée et retouchée)**

- On calcule la moyenne des cellules présentées dans les 5 rectangles (on obtient ainsi le nombre de cellules par rectangle). Cette moyenne sera multipliée par 100 (nombre de rectangle total) pour connaître le nombre d'entité cellulaire par mm<sup>3</sup>. (BONNEFOY C et *al.*, 2002)

### **III.3. Nettoyage après usage :**

- Immersion pendant 10 à 15 minutes dans un bain d'eau de javel dilué.
- Rinçage à l'eau du robinet puis à l'eau distillée.
- Essuyage avec linge fin ou papier absorbant non pelucheux (genre « Sopalin ») sans frotter.
- Laisser sécher à l'air libre durant quelques minutes.
- Ranger à l'abri des poussières. (CUZIAT J et *al.*, JUIN 2011)

# **CHAPITRE IV**

## **L'étalonnage de sperme**

## I. DEFINITION DE L'ETALONNAGE

La courbe d'étalonnage est la représentation graphique, exprimée en unité d'absorbance, d'une substance de concentrations variables mais connues et mesurées photométriquement à une longueur d'onde fixe pour laquelle elle a maximum d'affinité (CARRIER R, 1971). On détermine ainsi la limite de la linéarité de la courbe d'étalonnage (Absorbance = f [Spermatozoïde]). (SERGE B, 1985)

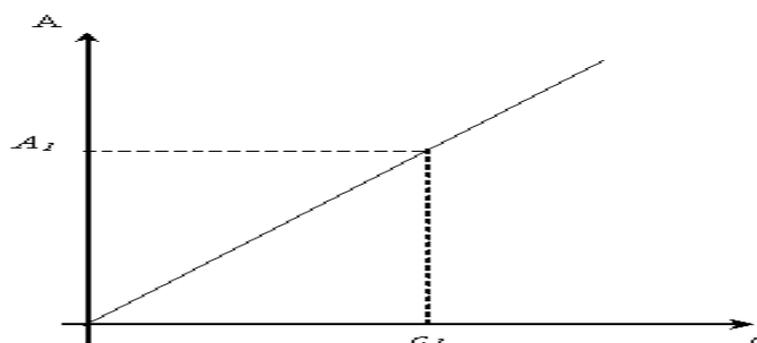
## II. PRINCIPE DE L'ETALONNAGE

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  $\text{mol.l}^{-1}$  ou concentration massique  $t$  en  $\text{g.l}^{-1}$ ).

Connaissant le spectre d'absorption d'une substance chimique, on peut mesurer, à l'une de ses longueurs d'onde  $\lambda_{\text{max}}$  (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  $A = f(c)$ .



**Figure 18 : Courbe d'étalonnage représentant la concentration (C) en fonction de l'absorbance (A) (wikipédia)**

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)

### III. REALISATION DE LA COURBE D'ETALONNAGE

Pour cela, on réalise une série de solutions filles préparées de différentes concentrations à partir d'une solution mère aqueuse préparée. 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 cette courbe de référence est nommée : courbe d'étalonnage. (BENAROUS K, 2006)

Cependant, dans le cas où l'étude de l'adéquation du modèle considéré comme linéaire, il convient d'étudier particulièrement tous les résidus ; les points suspects sont recherchés et éventuellement éliminés après justification. L'étude de l'adéquation du modèle linéaire de la gamme d'étalonnage est ensuite de nouveau effectuée. (EL MRABET K, 2001)

### IV. LES MODALITES DE L'ETALONNAGE

#### IV.1. Méthode d'étalonnage interne

Cette méthode consiste à introduire une quantité précise d'un étalon interne (qui est une substance non présente dans le mélange à doser et dont les grandeurs de rétention sont différentes de la substance à analyser) dans chaque solution contenant la substance à doser (échantillon et étalon).

Le choix de l'étalon interne est souvent difficile à faire. En effet, il doit avoir :

- Un comportement chromatographique très semblable à celui du composé à doser : ses grandeurs de rétention doivent être très proches mais bien distinctes.
- Il ne doit pas interférer avec les autres substances éventuellement présentes.
- Il doit avoir des propriétés identiques vis-à-vis du système de détection.

L'utilisation d'un étalon interne bien adapté peut conduire à des précisions relatives de 0,5 à 1%. (TRANCHANT J, 1995)

#### IV.2. Méthode d'étalonnage externe

C'est la méthode la plus directe d'analyse, consiste à préparer une série de solutions étalons dont la composition est proche de la solution inconnue. A partir des chromatogrammes des solutions étalons, on établit un graphique des aires des pics ou de leurs hauteurs en fonction de la concentration. La fonction ainsi obtenue doit être une droite qui passe par l'origine ; les analyses sont basées sur ce graphique.

La source d'erreur la plus importante, propre à cette méthode d'étalonnage, est généralement liée à l'incertitude sur le volume d'échantillon ; Il arrive aussi que la vitesse d'injection y contribue aussi. Les erreurs relatives sur le volume de l'échantillon peuvent être réduites à environ 1 ou 2% à l'aide d'une vanne à boucle d'échantillonnage. (BENAISSA A, 2011)

### **IV.3. Méthode des ajouts**

La méthode des ajouts dosés réside dans le fait de la disposition du produit pur pour effectuer l'ajout ; Et par le tracé d'une droite de régression, on aboutit à la mesure de la concentration initiale au croisement de l'axe des X.

Ainsi, cette méthode consiste à ajouter plusieurs fois un même volume d'une solution de concentration connue à un volume donné de concentration inconnue. Un travail graphique ou mathématique se basant aussi sur la proportionnalité entre A et C permet de trouver la concentration inconnue. Elle est la plus employée des deux. (POLSTER et LADMANN, 1989)

## **V. LES DIFFERENTS TYPES D'ETALON**

Il existe deux types d'étalon :

### **V.1. Etalon primaire**

Un étalon primaire est un composé de pureté suffisante duquel on peut préparer une solution étalon par pesée d'une certaine masse, suivie d'une dilution jusqu'à obtenir un volume donné de solution. La solution préparée est alors une solution étalon primaire. Ce dernier doit satisfaire aux critères suivants :

- Il doit être facile à obtenir, à purifier, à sécher (de préférence entre 110 et 120°C) et à conserver à l'état pur.
- La substance doit pouvoir subir des tests qualitatifs de sensibilité connue afin de connaître ses impuretés. (la teneur globale en impuretés ne doit pas, en général, excéder 0,01 ou 0,02%).
- Il doit avoir une masse moléculaire relative suffisamment élevée pour que les erreurs de pesée puissent être négligées.
- La substance doit être facilement solubilisée dans les conditions de l'expérience.

- La réaction avec la solution étalon doit être stœchiométrique et pratiquement instantanée. L'erreur de titrage doit être négligeable ou facile à déterminer expérimentalement avec précision.

Dans la pratique, il est difficile d'avoir un étalon primaire idéal et l'on doit habituellement faire des compromis.

Exemple d'étalon primaire : réaction acido-basique (carbonate de sodium  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), réaction de précipitation (argent, chlorure de sodium...), réaction d'oxydoréduction (bromate de potassium  $\text{KBrO}_3$ ...), réaction de formation de complexes comme les métaux purs (zinc, magnésium) et sels. (MENDHAM J et *al.*, 2005)

## V.2. Etalon secondaire

Un étalon secondaire est une substance qui peut être utilisée pour des étalonnages dont la teneur en substance active a été mesurée par comparaison avec un étalon primaire. Il s'ensuit qu'une solution étalon secondaire est une solution dont la concentration en soluté n'est pas connue à partir de la masse du composé dissous, mais à partir de la réaction d'un certain volume de la solution (titrage) par un volume mesuré d'une solution étalon primaire. (MENDHAM J et *al.*, 2005)

## VI. L'INCERTITUDE DE L'ETALONNAGE

Dans la détermination de l'incertitude d'un résultat d'analyse on est amené à prendre en compte la composition d'un certain nombre d'erreurs, et celle liée à la courbe d'étalonnage est le plus souvent incontournable.

L'étalonnage conduit très souvent à établir une droite de régression ( $y = ax + b$ ) par la méthode des moindres carrés à partir d'une série d'étalons  $x_i$ . Il faut souligner le fait qu'avant même la construction de cette droite, il serait nécessaire en toute rigueur de faire une analyse de la variance des points expérimentaux qui servent à cette construction. En effet, la méthode classique suppose une variance constante de Y sur la plage d'étalonnage. Ceci est rarement le cas en analyse où le plus souvent la variance croît avec le signal et c'est l'erreur relative qui est en revanche approximativement constante.

L'utilisation systématique de la méthode classique (variance constante) là où elle n'est pas vraiment adaptée va entraîner un biais sur les paramètres a et b de la droite et sur la variance qui vont servir à évaluer la valeur  $x_k$  d'un échantillon et son incertitude à partir d'un signal analytique  $y_k$ .

La droite des moindres carrés d'équation ( $y = ax + b$ ), obtenue à partir d'un ensemble de  $n$  points expérimentaux  $(x_i, y_i)$  passe par le point moyen  $(\bar{x}, \bar{y})$ . L'incertitude sur ce point est supposée liée uniquement à l'incertitude sur  $y$ . La pente déterminera ensuite la position de la droite.

L'incertitude liée au résultat obtenue à partir de la droite d'étalonnage dépendra donc :

- De l'incertitude sur la pente «  $a$  » ;
- De l'incertitude sur le point moyen  $(\bar{x}, \bar{y})$ .

En plus de ces incertitudes liées à la courbe d'étalonnage, on devra tenir compte également de l'incertitude sur la mesure  $y_k$  de l'échantillon. (FEINBERG M, 1996)

Après avoir établi l'équation de la droite de régression, le degré de la relation entre les deux variables  $(x, y)$  est exprimé par le **coefficient de régression (noté  $R^2$ )**. Il est égal à 1 dans le cas où l'une des variables est une fonction affine croissante de l'autre variable, à -1, dans le cas où l'une des variables est une fonction affine décroissante. Les valeurs intermédiaires renseignent sur le degré de dépendance linéaire entre les deux variables.

**PARTIE**  
**EXPERIMENTALE**

Ces dernières années un grand intérêt est assigné à l'étude de l'effet de certaines substances pharmaceutiques, botaniques ou écologiques ... sur la reproduction. En effet, parmi les plus importants paramètres de spermogramme, existe la concentration spermatique. L'étude de ce paramètre à l'aide de l'hématimètre est très laborieuse et nécessite beaucoup de temps. Ainsi, les laboratoires spécialisés ont opté à l'utilisation des propriétés d'absorption de la lumière monochrome par les solutions à l'aide du spectrophotomètre. Notre étude s'inscrit dans l'optique d'étalonnage du spectrophotomètre par une cellule de comptage (La Malassez) pour l'espèce bovine et ovine avec la même longueur d'onde de lecture.

## I. MATERIEL ET METHODE

### I.1. Matériels

#### I.1.1. Matériel animal

Onze testicules entre ceux de bovins et d'ovins étaient fraîchement recueillis après abattage de l'abattoir d'El-Harrach. Toutefois, trois parmi-eux (01 bovin et 02 ovin) étaient éliminés en vue de récolte infructueuse (testicules de petites tailles supposant que les mâles étaient immatures).



**Figure 19 : Récolte infructueuse d'une semence bovine (à gauche) et récolte de semence réussie (à droite)**

Le nombre de testicules retenus dans notre étude est :

- 5 testicules appartenant à l'espèce bovine
- 3 testicules appartenant à l'espèce ovine

### I.1.2. Matériels de collecte du sperme

- Seringue grande capacité (20 et 50 ml)
- Eau physiologique (0,9 % NaCl)
- Eppendorf graduée
- Lame de Bistouri
- Trousse de dissection chirurgicale (ciseau et pinces)

### I.1.3. Matériels d'évaluation de la concentration spermatique

- Cellule de Malassez (Figure 13)
- Spectrophotomètre (Erma<sup>®</sup> AE600), (Figure 20)

### I.1.4. Matériels de dilution du sperme (préparation de la semence)

- Micropipette fixe 100 µl
- Micropipette fixe 1000 µl
- Embouts pour les micropipettes (jaunes et bleus)
- Formaldéhyde à 10 %

## I.2. Méthodes

### I.2.1. Collecte de la semence

Conservé a une température ambiante après sa récupération de l'abattoir, le testicule est alors rincé avec l'eau du robinet, puis dénudé de sa vaginale par incision franche à l'opposé du complexe épидидymaire, se dernier va être à son tour dilacéré de façon manuelle ou en faisons une boutonnière sous le corps de l'épididyme. La méthode de collecte adoptée était celle décrite par **GUÉRIN Y *et al.*, 2003**, sauf qu'on a utilisé l'eau physiologique au lieu de l'huile de paraffine. Le contenu du tubule de la région caudale a été perfusé à l'aide d'une aiguille insérée dans la lumière du canal déférent de la partie caudale de l'épididyme. On vérifie l'intégrité du canal tout en introduisant avec une pression constante le sérum physiologique, une incision touchant les canaux superficiels et profonds est faite au niveau de la région déclive de la queue de l'épididyme et la semence est alors récoltée dans une Eppendorf.

la collecte est faite au niveau du laboratoire de physio-repros et les volumes des liquides obtenus sont représentés dans le tableau 4 :

**Tableau 4 : Les volumes de sperme épидидymaires récoltés**

<b>Espèce</b>	<b>Volume</b>
BV <sub>1</sub>	0,9 ml
BV <sub>2</sub>	0,7 ml
BV <sub>3</sub>	1,45 ml
BV <sub>4</sub>	0,7 ml
BV <sub>5</sub>	1 ml
OV <sub>1</sub>	0,7 ml
OV <sub>2</sub>	0,9 ml
OV <sub>3</sub>	1,2 ml

**I.2.2. Dilution de la semence**

Pour chaque échantillon collecté, plusieurs dilutions sont faites à partir de sperme pur. On a commencé par une dilution de 1/10 : on a pipeté 9 volumes (1 volume est égal à 100 µl) de formaldéhyde (correspondant à 900µl) et on les a mis dans une éppindorf, puis on a rajouté 01 volume de sperme pur. En fin, la solution obtenue est mélangée à l'aide d'un agitateur (vortex®). Puis, on a procédé par la même manière afin d'obtenir les différents taux de dilution souhaités qui sont présentés dans le tableau 5

**Tableau 5 : Représentant les différents systèmes de dilution (1 volume est égal à 100 µl).**

<b>Taux de dilution</b>	<b>Formaldéhyde 10 %</b>	<b>Solution mère (sperme)</b>
1/10	09 Volume	01 Volume du sperme pur
1/100	09 Volume	01 Volume à 1/10
1/200	05 Volume	05 Volume à 1/100
1/400	09 Volume	03 Volume à 1/100
1/600	10 Volume	02 Volume à 1/100
1/800	14 Volume	02 Volume à 1/100
1/1000	09 Volume	01 Volume à 1/100

### I.2.3. Comptage des spermatozoïdes par la Malassez

Avant la lecture, chaque solution diluée est agitée par un vortex pour l'homogénéisation du contenu.

- la solution est déposée sur la lame de Malassez à l'aide d'une micropipette afin de remplir par capillarité les deux chambres.
- 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 x10), les éléments sont comptés au microscope au grossissement x40. 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.

### I.2.4. Mesures par spectrophotomètre

Dans notre étude nous avons utilisé le model AE600 qui est un spectrophotomètre semi-automatique qui couvre une longueur d'onde allant de 340 nm jusqu'à 999 nm.

- Nous avons utilisé une longueur d'onde commune aux deux espèces : 590 nm
- Pour la mesure de l'absorbance il faut suivre les étapes ci-dessous :
- Réglage du spectrophotomètre sur une longueur d'onde 590 nm et détermination du zéro d'absorbance sur le « blanc » qui correspond au dilueur sans spermatozoïdes « formaldéhyde » utiliser dans notre cas.
- Agitation des différentes solutions en utilisant le vortex.
- Lecture des absorbances qui correspondent à chaque dilution au spectrophotomètre.



**Figure 20 : Spectrophotomètre AE600 (laboratoire de physio-repros. ENSV)**

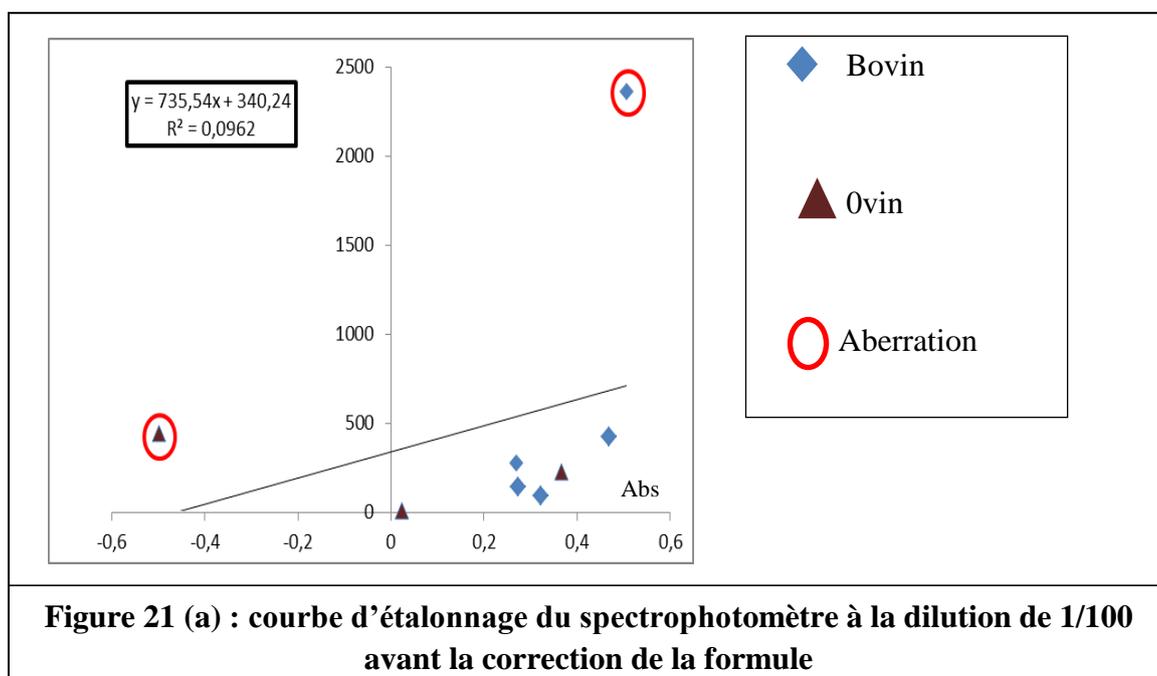
## II. COURBE D'ETALONNAGE DU SPECTROPHOTOMETRE POUR LA DETERMINATION DE LA CONCENTRATION DE LA SEMENCE BOVINE ET OVINE

Avant de procéder à l'étalonnage, il est à noter qu'on a effectué 08 fois la lecture par la Malassez pour chaque échantillon et pour chaque dilution. Ainsi, on a calculé la moyenne et l'écart type de ces 08 lectures. Ensuite, on a calculé le coefficient de variation (CV) correspondant. Les moyennes requises pour chaque échantillon étaient celles qui présentaient un CV inférieur à 25 %. On a procédé, après, à l'élimination des valeurs susceptibles d'être l'origine de l'écart observé pour toutes les moyennes ayant un CV supérieur (Annexe).

### II.1. Courbe d'étalonnage du spectrophotomètre à la dilution 1/100

La figure 21 représente la droite d'étalonnage du spectrophotomètre par la cellule de Malassez à la dilution 1/100, reliant ainsi les valeurs de l'absorbance et leur concentration spermatique. On remarque dans la figure 21 (a) une très faible corrélation entre ces deux valeurs sanctionnée par un  $R^2$  se rapprochant de zéro ( $R^2 = 0,0962$ ) avec une équation donnée comme suit :

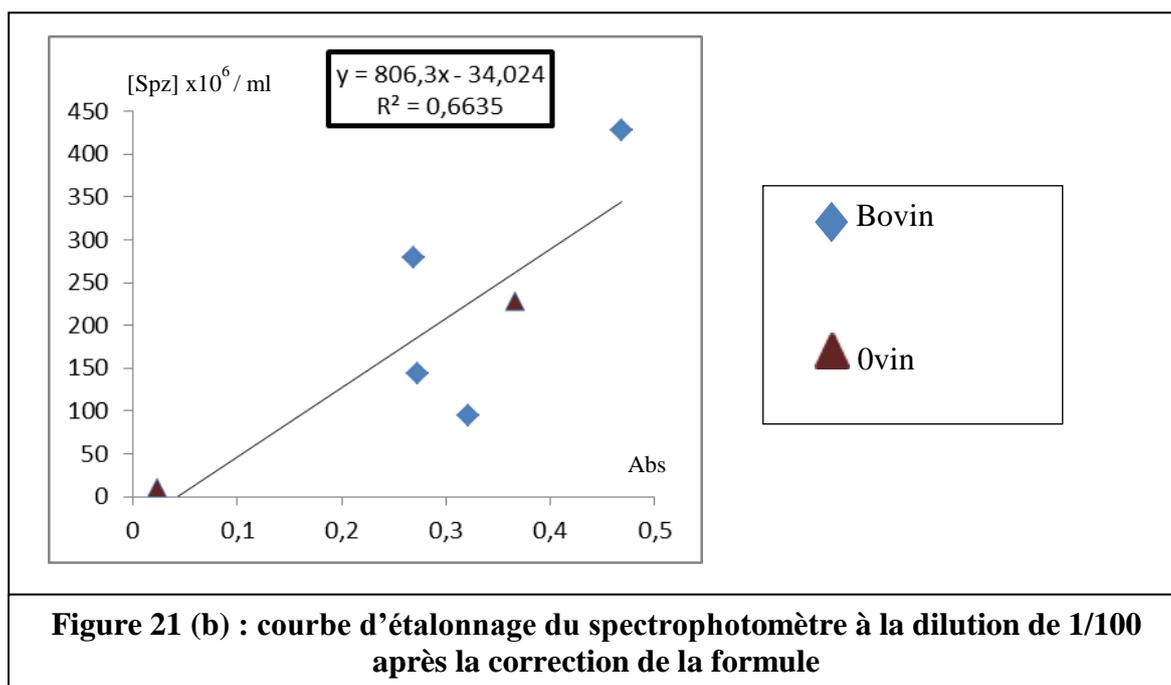
$$Y=735,54x + 340,24 \dots\dots\dots (1)$$



Ce qui montre une grande différence entre la lecture avec la Malassez et l'absorbance correspondante de l'échantillon par le spectrophotomètre. Cependant, après avoir enlevé les valeurs susceptibles d'être des aberrations (en cerclées par le rouge dans la figure 21 (a) à savoir BV (0,506 ; 2365,6), OV (-0,499 ; 443,8), le  $R^2$  sera égal alors à 0,6635 représenté dans l'équation (2). EVENSON et *al.*, 1993, ont rapporté que le coefficient de corrélation entre la concentration déterminée par un hématimètre et l'absorbance correspondante est de 0,9652 mais à une dilution de 1/10.

$$Y = 806,3x - 34,024 \dots\dots\dots (2)$$

Toutefois, malgré cette amélioration, le ( $R^2$ ) reste relativement faible. De cet effet, l'équation (2) ne représente pas assez fidèlement la relation linéaire entre l'absorbance et la concentration. En conséquence, tout est relié à des erreurs absolues commises soit dans la mesure de l'absorbance ou soit dans le calcul de la concentration spermatique. La première supposition est écartée en vue de la précision de l'appareil, par contre les erreurs peuvent être faites lors du comptage de la concentration spermatique avec Malassez pour plusieurs raisons (l'opérateur, l'homogénéité de l'échantillon, effets optiques de l'intensité de la lumière et la mise au point du microscope).



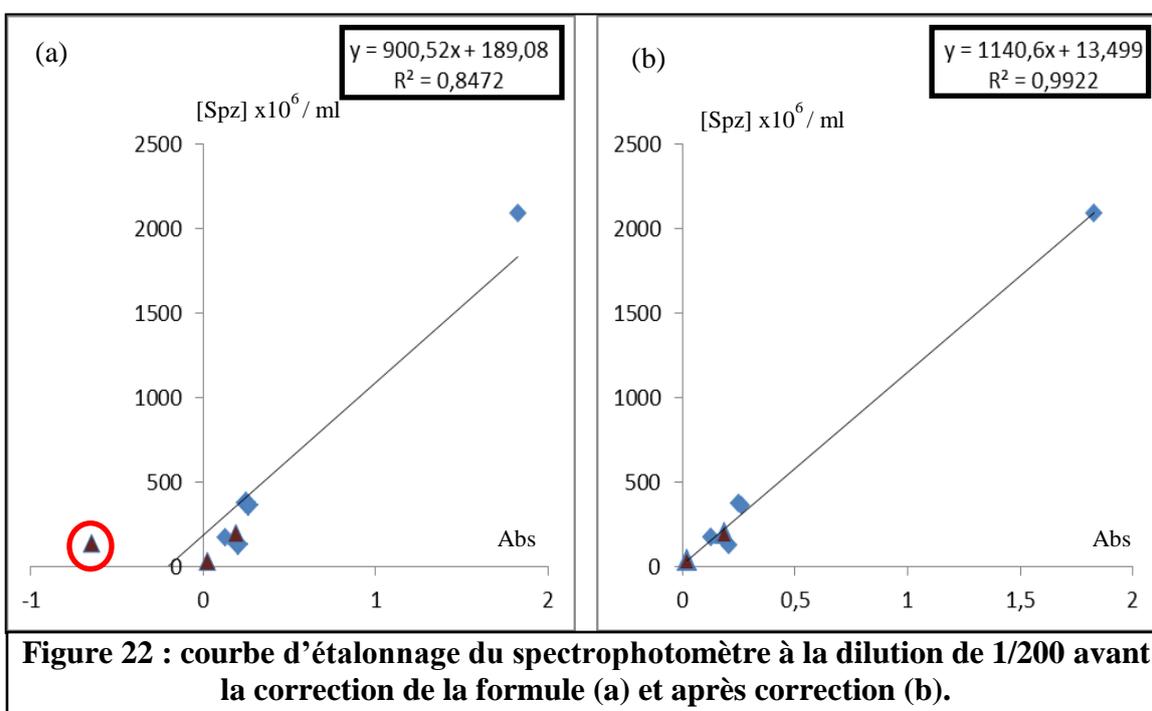
## II.2. Courbe d'étalonnage du spectrophotomètre à la dilution 1/200

Une forte corrélation entre les valeurs de l'absorbance et leur concentration spermatique est démontrée par la figure 22 qui représente la droite d'étalonnage du spectrophotomètre à la dilution 1/200 ; on remarque ainsi cette corrélation dans la figure 22 (a) qui est représentée par un  $R^2 = 0,8472$  dont l'équation correspondante est décrite comme suit :

$$Y = 900,5x + 189,0 \dots\dots\dots (3)$$

Toutefois, la figure 22 (b) représentant la courbe d'étalonnage du spectrophotomètre après correction montre aussi que cette corrélation est plus précise après enlèvement d'une seule aberration seulement OV (-0,649 ; 142) ce qui rend cette équation candidate à être retenue pour une meilleure estimation de la concentration avec le spectrophotomètre. Cela est raisonné par un  $R^2 = 0,9922$  et son équation est:

$$Y = 1140x + 13,49 \dots\dots\dots (4)$$



### II.3. Courbe d'étalonnage du spectrophotomètre à la dilution 1/400

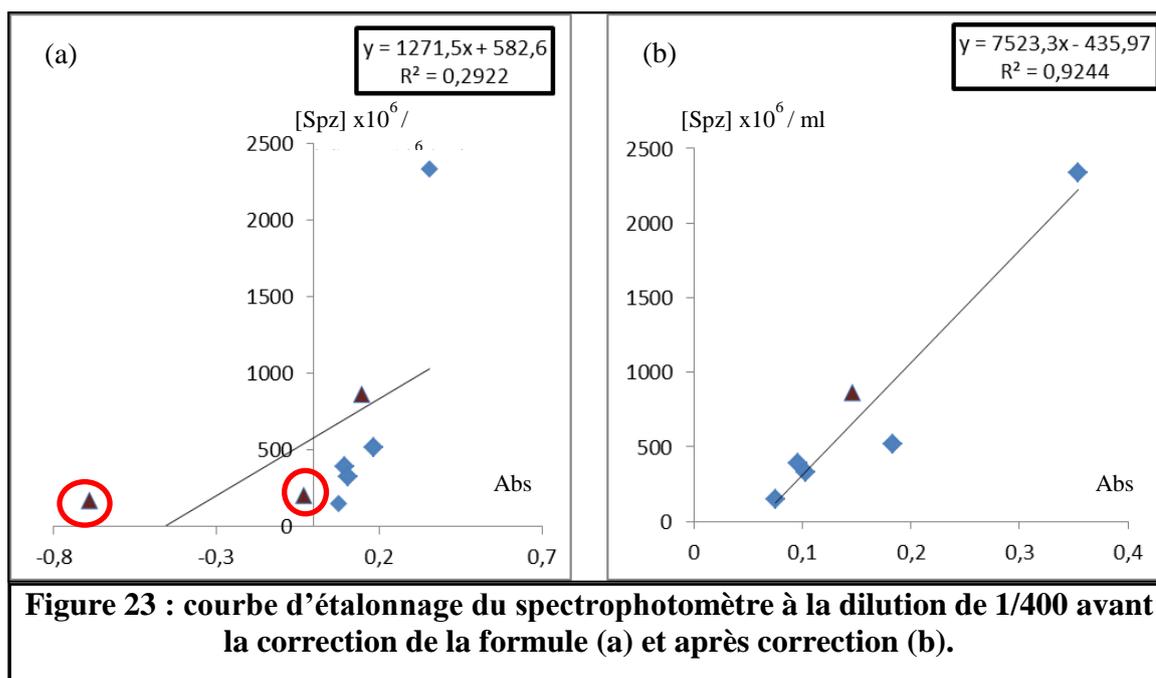
La droite d'étalonnage montrée croissante dans la figure 23 (a) toutefois, exposant un coefficient de corrélation faible ( $R^2=0,2922$ ). L'équation correspondante est exprimée par :

$$Y = 1271,5x + 582,6 \dots\dots\dots (5)$$

Par contre après avoir ôté les valeurs susceptibles d'être des aberrations statistiques : OV (- 0,032 ; 204,8), OV (- 0,69 ; 170,8) comme démontre la figure 23 (b). La relation entre les  $x$  et les  $y$  est devenue plus forte avec un  $R^2 = 0,9244$ . On constate, donc, une intimité entre la concentration est l'absorbance correspondante. En conséquence, l'équation (6) pourrait être recommandée comme une équation correcte d'étalonnage.

L'équation est décrite avec :

$$Y = 7523,3x - 435,97 \dots\dots\dots (6)$$



#### II.4. Courbe d'étalonnage du spectrophotomètre à la dilution 1/600

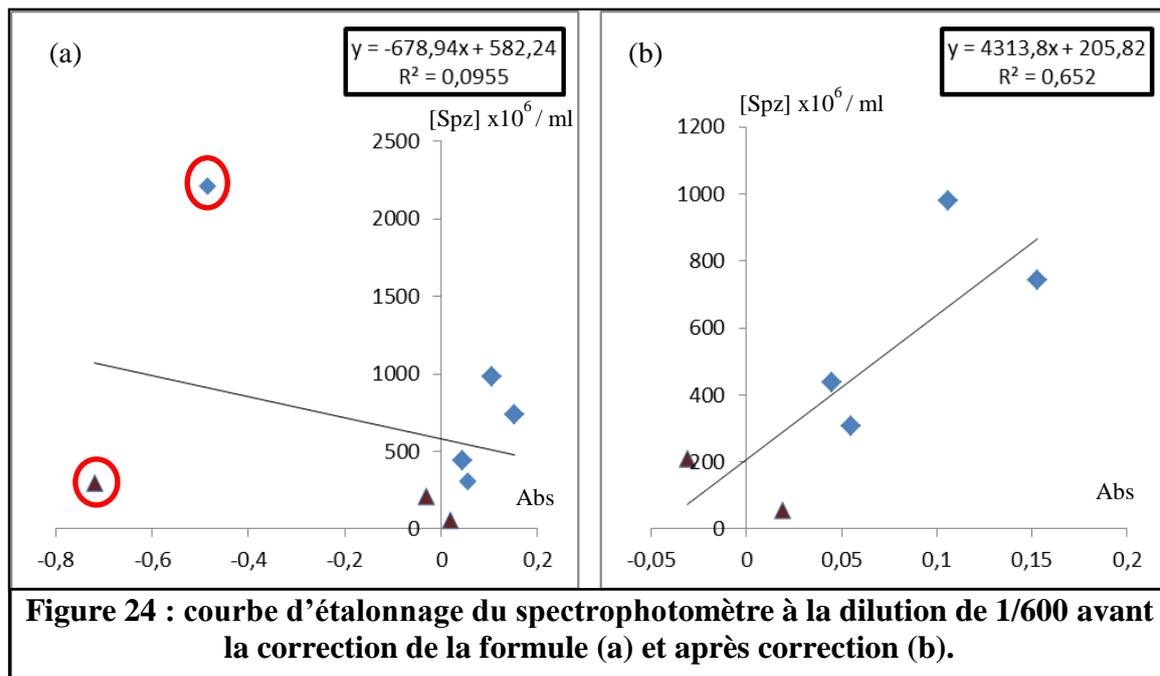
Une courbe d'étalonnage du spectrophotomètre à la dilution de 1/600 est représentée dans la figure 24 montrant une faible corrélation à moyenne entre les valeurs de l'absorbance et les concentrations correspondantes et aussi une contradiction dans le type de corrélation. En effet, on est censé d'avoir dans ces cas d'expérimentations des corrélations plutôt positives et non des corrélations négatives comme le montre la figure 24 (a). Cela pourrait être imputé majoritairement à une fausse interprétation de la concentration avec la Malassez ou bien à la longueur d'onde choisie dans notre travail qui ne correspondrai pas à la longueur d'onde d'absorption maximale (souvent notée  $\lambda_{\max}$ ) augmentant ainsi la marge d'erreur de la lecture d'absorbance, se traduisant par une valeur inférieure de l'échantillon par rapport à celle du « blanc ».

Le coefficient de corrélation obtenue dans la figure 4 (a) est faible avec une valeur de 0,0955 et l'équation correspondante est :

$$Y = -678,94x + 582,42 \dots\dots\dots (7)$$

En revanche, l'enlèvement de quelques aberrations statistiques représentées dans la figure 24 (a) BV (-0,485 ; 2211), OV (-0,719 ; 297) a fait que le coefficient de corrélation augmente jusqu'à atteindre la valeur de 0,652 mais reste relativement faible, comme montre la figure 24 (b), et son équation sera présentée par :

$$Y = 4313,8 x + 205,82 \dots\dots\dots (8)$$



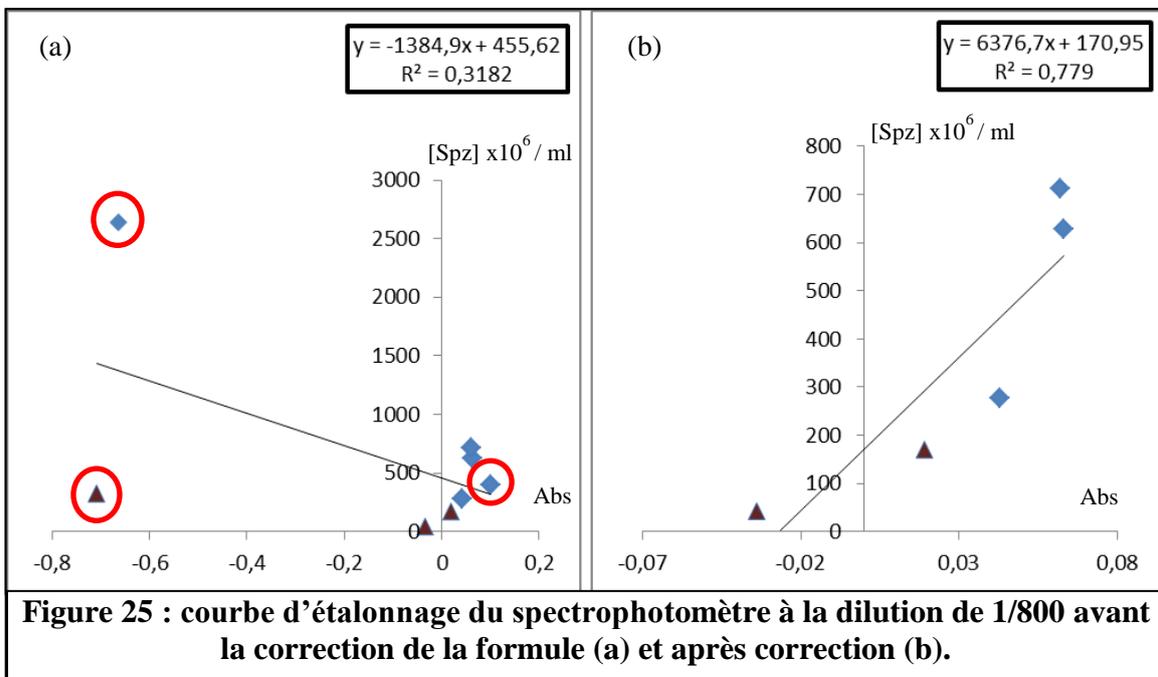
## II.5. Courbe d'étalonnage du spectrophotomètre à la dilution 1/800

La figure 25 (a) montre une courbe d'étalonnage, étonnement, décroissante du spectrophotomètre à la dilution de 1/800 et ceci peut être dû soit à une erreur de comptage par Malassez, soit à la longueur d'onde choisie dans notre travail qui a pu être liée à des interférences qui ont orienté le type de corrélation. Selon (BURGOT G ET BURGOT J, 2006) une bande passante de lumière incidente trop large entraîne imprécision sur la valeur de coefficient d'absorption qui se traduit par un écart à la linéarité. Ainsi on a obtenu à la dilution 1/800 une valeur du  $R^2$  qui est égale à 0,3182 avec une formule de :

$$Y = -1384,9x + 455,62 \dots\dots\dots (9)$$

Tandis que la figure 25 (b) faite après élimination de trois valeurs considérées comme aberrantes BV (0,1 ; 400), BV (-0,664 ; 2640), OV (-0,709 ; 325,6) démontre une concordance entre les valeurs de concentration et les absorbances correspondantes, définit alors par un  $R^2 = 0,779$  et l'équation suivante :

$$Y = 6376,7 x + 170,95 \dots\dots\dots (10)$$



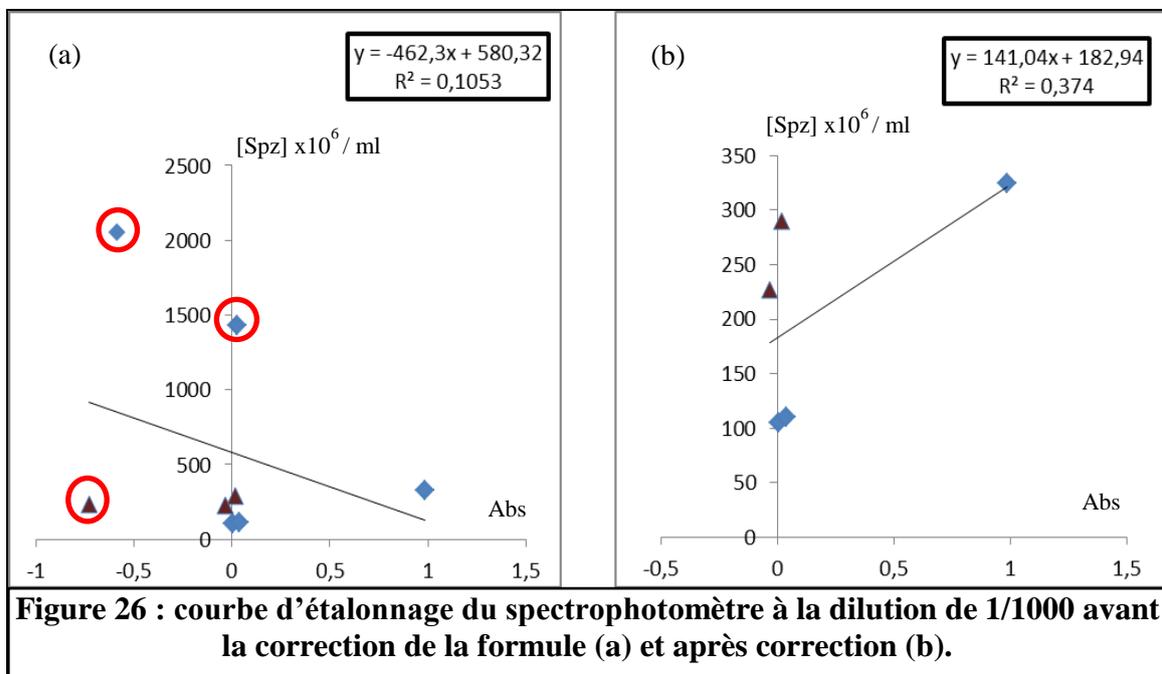
## II.6. Courbe d'étalonnage du spectrophotomètre à la dilution 1/1000

D'après la figure 26 (a) on remarque une très faible corrélation entre les valeurs des  $x$  et des  $y$ . Supposant ainsi que ce résultat est lié, fort probablement, à une homogénéité inadéquate de l'échantillon. Cependant, il est bien établi que lors des fortes dilutions (supérieure à 1/1000) une différence de lecture avec la Malassez est de taille. Effectivement, un spermatozoïde compté en plus ou en moins, correspond à une surestimation ou à une sous-estimation de 100 million de Spz dans la concentration finale. Ce phénomène est illustré dans notre étude par un faible coefficient de corrélation ( $R^2 = 0,1053$ ) avec une équation déduite comme suit :

$$Y = -462,3x + 580,32 \dots\dots\dots (11)$$

Malgré avoir retiré quelques valeurs statistiques, BV (0,026 ; 1427), BV (-0,587 ; 2055), OV (-0,728 ; 233) qui embrouillaient l'allure logique de la droite de corrélation (c'est-à-dire : une corrélation strictement positive), le  $R^2$  est égal à 0,374 demeurant toujours faible (figure 26 (b)) dont l'équation est décrite avec :

$$Y = 141,04 x + 182,94 \dots\dots\dots (12)$$



**CONCLUSION**  
**ET**  
**RECOMMANDATION**

# **ANNEXE**

# **BIBLIOGRAPHIE**

**AUDIGIE C., DUPONT G., ZONZAIN F., 1995** : Principes des méthodes d'analyse biochimique .tome I. Editions DOIN. Pages 112-113.

**BALEDENT F., 2000** : Biologiste, hôpital de Saint-Denis, France Développement et Santé, n°148, août 2000

**BENAISSA AKILA., 2001** : Etude de la dégradation photocatalytique d'un colorant synthétique et d'un tensioactif.

**BARIL G., CHEMINEAU P., COGNIE Y., GUERIN Y., LEBOEUF B., 1993** : Manuel de formation pour l'insémination artificielle chez les ovins et les caprins. Rome . FAO.

**BARONE R., 2001** : Appareil génital mâle. In: Anatomie compare des mammifères domestiques. Tome 4. Splanchnographie II. Vigot 2001.

**BARONE R., 1990** : Anatomie comparée des mammifères domestiques . Tome 4 Splanchnologie. Paris : Vigot .1990 . 501p.

**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.

**BONNEFOY C; GUILLET F ; LEYRAL G ; VERNE-BOURDAIS E., 2002** : Microbiologie et qualité dans les industries agro-alimentaires. Rueil-Malmaison. Doin

**BURGOT G et BURGOT J L., 2006** : Méthodes instrumentales d'analyse chimique et applications. Edition LAVOISIER.

**CARRIER R., 1971** : Biochimie médicale principe généraux de l'analyse en biochimie médicale. Notions élémentaires de méthodologie instrumentale

**COLES E H., 1979** : Le laboratoire en clinique vétérinaire. Éditions VIGOT. Page 53.

**CUZIAT J., PIERSON A., HELFRE M., 12 juin 2011** : Biologie tropical

**DACHEUX F et J-L., 2001 (a)** : L'épididyme et les glandes annexes. La Reproduction chez les mammifères et l'homme. Nouvelle édition. Paris. INRA Editions ellipses page 290-315.

**DADOUNE J-P et DEMOULIN A., 2001** : Structure et fonctions du testicule. La Reproduction chez les mammifères et l'homme. Nouvelle édition. Paris : INRA Editions ellipses. Page 256-289.

**DUMONT P., 1197 :** Appréciation de la fonction sexuelle du taureau reproducteur .  
Le Point Vétérinaire. Page 1617-1628.

**ELMORE R G., 1996 :** Evaluation des résultats de la campagne d'insémination artificielle bovine dans le département de Mbour au Sénégal : cas du projet GOANA (Grande Offensive Agricole pour la Nourriture et l'Abondance).

**EVENSONS D P., PARKS J., KAPROTH M T., JOST LORNA K., 1993 :** Rapid Determination on Sperm Cell Concentration in Bovine Semen by Flow cytometry .  
1993.

**EZEKWE A G., 1988:** Ejaculate characteristics of two breeds of tropical bulls. N'dama and Muturu. Joint seminar on animal reproduction for african countries. Addis-Abeba:CIPEA.

**FEINBERG M ., 1996 :** La validation des méthodes d'analyse . Edition MASSON

**GRIGNARD E., 2005:** Analyse de protéines spermatiques post-testiculaires, et développement d'outils pour le contrôle de la fertilité de différents mammifères, thèse de Magister. 2005.

**GUÉRIN Y., DACHEUX J L., LOCATELLI J., COMIZOLLI P., MAUGET R., MERMILLOD., LEGENDRE X., GATTI J., 2003 :** Conservation et utilisation du sperme épидидymaire d'ovins et de cervidés en insémination artificielle et fécondation in vitro. Les Actes du BRG. 4 .page 173-183.

**Hanzen CH 2009 2010 :** La propédeutique de l'appareil reproducteur et l'examen du sperme des ruminants. Année 2009-2010.

**Henkel James 1978:** Essentials of drug product quality. The Mosby Company. page. 130,133

**HOCHEREAU, M. T. et al 1964.** – Durée de la spermatogénèse chez le taureau : étude par autoradiographie testiculaire. 5th. Int. Congr. Anim. Reprod. Artif. Insem. 1964. Page 541

**HOUDEAU, E, PRUD'HOMME M-J, RAMPIN, O et al.** Innervation de l'appareil génital : organisation anatomique, nature et fonctions. . In : THIBAUT, C et LEVASSEUR, M-C : La Reproduction chez les mammifères et l'homme. Nouvelle édition. Paris. INRA Editions ellipses, 2001, 425-456

**Kheradmand A., Babaei H., et Batavani R., 2006:** Effect of improved diet on semen quality and scrotal circumference in the ram. VETERINARSKI ARHIV 76 .333-341, 2006

**KNOBIL E., NEILL J., 1988:** The Physiology of Reproduction .Raven Press, 1988. 793-814.

**MENDHAN J., DENNEY R.C., BARNES J.D et M.THOMAS., 2005 :** Analyse chimique quantitative de Vogel. 6ème édition BOECK par Jean Toullec et Monique.

**Mottet-POLSTER et LADMANN., 1989 :** Spectrometric titrations-VCH.

**Mlle EL MRABET KHADIDJA., 2001 :** Développement d'une méthode d'analyse de résidus de pesticides par dilution isotopique associée à la chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem dans les matrices céréalières après extraction en solvant chaud pressurisé.

**RIGAL Fabrice., Benoît., Guillaume., 2008 :** Comparaison De La qualité De La Semence De Taureaux Collectes A L'électro-Ejaculateur Ou Au Vagin Artificiel

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

**SERGE BERNARD., 1985 :** biochimie clinique instrument et technique de laboratoire diagnostics médico-chirurgicaux. Édition MALOINE

**SETCHELL B P., 2007:** Male reproductive organs and semen. In: PERRY, T. Reproduction in domestic animals.4<sup>e</sup>édition. San Diego. Academic Press.INC. 1991, 251-278.

**Skoog, et. al., 2007:** Principles of Instrumental Analysis. 6<sup>th</sup> ed. Thomson Brooks /Coles. 2007.

**TRANCHANT JEAN., 1995 :** Manuel pratique de chromatographie en phase gazeuse. 4ème Edition. MASSON. 1995.

## Résumé :

Le but de notre travail était de déterminer la meilleure courbe d'étalonnage du spectrophomètre par la cellule de Malassez commune pour l'espèce bovine et ovine afin d'estimer leurs concentrations spermatiques épididymaires. Les échantillons du sperme sont obtenus à partir de 05 testicules bovins et 03 testicules ovins. La lecture avec la Malassez est effectuée 08 fois pour le même mâle et pour chaque dilution appliquée (1/100, 1/200, 1/400, 1/600, 1/800 et 1/1000). Puis, elles sont suivies par une mesure de l'absorbance par spectrophotométrie. Les meilleures formules retenues sont celles de la dilution 1/200 et 1/400 dont le R<sup>2</sup> est proche de 1. Elles sont données respectivement :  $y=1140 x + 13,49$  et  $y = 7523,3 x - 435,97$ .

**Mots clés :** Sperme épididymaire, Malassez, Spectrophotomètre, Etalonnage, Bovin, Ovin.

## Abstract:

The aim of our study was to determine the best calibration curve of the spectrophotometer by the unit Malassez common for bovine and ovine species to estimate their epididymal sperm concentrations. Semen's samples were obtained from 05 cattle's testicles and 03 sheep's testicles. The reading is performed with Malassez 08 times for the same male and for each dilution (1/100, 1/200, 1/400, 1/600, 1/800 and 1/1000). Then, they are followed by measuring the absorbance by spectrophotometry. The best formulas used are those of the 1/200 dilution and 1/400, whose R<sup>2</sup> is close to 1. They are given respectively:  $y = 1,140 x + 13.49$  and  $y = 7523.3 x - 435.97$ .

**Keywords:** Epididymal sperm, Malassez, Spectrophotometer, Calibration, Cattle, Sheep.

## ملخص

كان الهدف من دراستنا تحديد أفضل منحنى معمل معايرة بواسطة خلية مالاسيه مشتركة بين أنواع الأبقار والأغنام من أجل تقدير تركيزات السائل المنوي البربخي لديهم. وقد تم الحصول على العينات من 05 خصيتين من البقري و03 خصيتين من الأغنام.

تم تنفيذ القراءة بملاسيه 08 مرات لنفس الذكر وتطبيقها لكل تخفيف (1/100، 1/200، 1/400، 1/600، 1/800 و1/1000). ثم تم اتباعها من خلال قياس الامتصاصية بواسطة القياس الطيفي.

أفضل الصيغ المستخدمة هي تلك التخفيف 1/200، 1/400 والتي يكون فيها  $r^2$  قريب من 1 و يتم منحهم على التوالي

ص = 1401 س + 13.49 و ص = 7523,3 س - 435.97

كلمات البحث: بربخي الحيوانات المنوية ، ملاسيه، طيفي، معايرة، الأبقار، الأغنام