

*République Algérienne Démocratique et Populaire*  
*Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique*  
**Université Abderrahmane MIR-Bejaia**

**Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie**  
**Département de Sciences Biologiques de l'Environnement**  
**Filière: Sciences Biologiques**  
**Option: Bio-ressource animale et Biologie intégrative**



Mémoire de Fin de Cycle  
En vue de l'obtention du diplôme

## **MASTER**

### *Thème*

**Etude comparative de quelques  
méthodes d'analyse de la qualité du  
sperme bovin**

Présenté par:

**Melle. SMAHI Hayet & Melle. NASRI Hedjila**

Soutenu le : **Dimanche 18 Juin 2017 à 13<sup>h</sup>00 .Salle 12**

Devant le jury composé de :

|                         | <b>Grade</b> |           |
|-------------------------|--------------|-----------|
| Mme TALBI Asma          | MAA          | Président |
| Mr NAIT MOULOUD Mohamed | MAA          | Encadreur |
| Mme HAMAIDI . Ghania    | MAA          | Examineur |

**Année universitaire: 2016/2017**

## *Remerciements*

*Nous tenant tout d'abord à remercier Dieu le tout puissant de nous avoir donné la foi, la force et la patience pour réaliser ce modeste travail.*

*Nous tenant à exprimer nos sincères considérations et remerciements à notre promoteur Mr Naït-mouloud M, pour ses précieuses conseils, son aide, son orientation, sa gentillesse et sa générosité. Qu'il veuille bien agréer notre profonde et éternelle gratitude.*

*Nous tenant à remercier également les membres de jury : Mme Talbi de nous avoir fait l'honneur de présider ce travail et Mme Hamaidi ghania d'avoir accepté de consacrer son temps pour l'évaluation de ce travail.*

*Nous remercions s'adressent aussi à l'ensemble des personnels du laboratoire de biologie animale du bloc 12.*

*Nous tenant à remercier également l'ensemble du personnels du l'Abattoir communal de Bejaia et sur tout le cheffe de l'abattoir pour son patience, son sympathie et le temps qu'il nous en consacré.*

*Enfin nous n'oublions pas de remercier tout la promotion BRA33 avec qui nous avons passé des moments agréables et tout ceux et celles qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.*

*Merci à tous.*

## *Dédicace*

*Je dédie ce fruit de fin de cycle en premier lieu à mes chers qui ont sacrifié pour mon bonheur :*

- ❖ *Mon cher père « Nava Driss », que dieu l'accueille dans son vaste paradis.*
- ❖ *Ma chère « Omma Lalia »*

*Je le dédie également à :*

- ❖ *Ma sœur Nassima « Simou »*
- ❖ *Mes chers frères : Nabil, Zahir*
- ❖ *Mon frère Da l'Mouloud et toute sa famille, d'Abid et toute sa famille ainsi que Da Mustapha et sa femme*
- ❖ *Me trois sœurs ami Zahia, Phasia et Zina*
- ❖ *A ma chère binôme et amie ABEJOLA et à toute sa famille.*

*Ainsi qu'à tous les amis de ma vie.*

*Hayete*

## *Dédicaces*

*Je remercie le bon dieu de m' avoir donné le courage pour réaliser ce travail et la patience pour aller jusqu'au bout du parcours de mes études.*

*Je dédie du plus profond de mon cœur ce manuscrit :*

*A mon cher père qui m'a toujours soutenu et conseillé dans ma vie.*

*A ma chère mère qui a toujours été là pour moi, je la remercie pour ses encouragements et son soutien. Que dieu leurs accorde une longue vie.*

*A mes frères : Hicham et Oussama.*

*A mon sœurs : Siham et son mari Isam et son fils laouay ,  
Hassiba et son mari Nadjim , Karima et son mari Anis ,  
Malia,  
Mariam .*

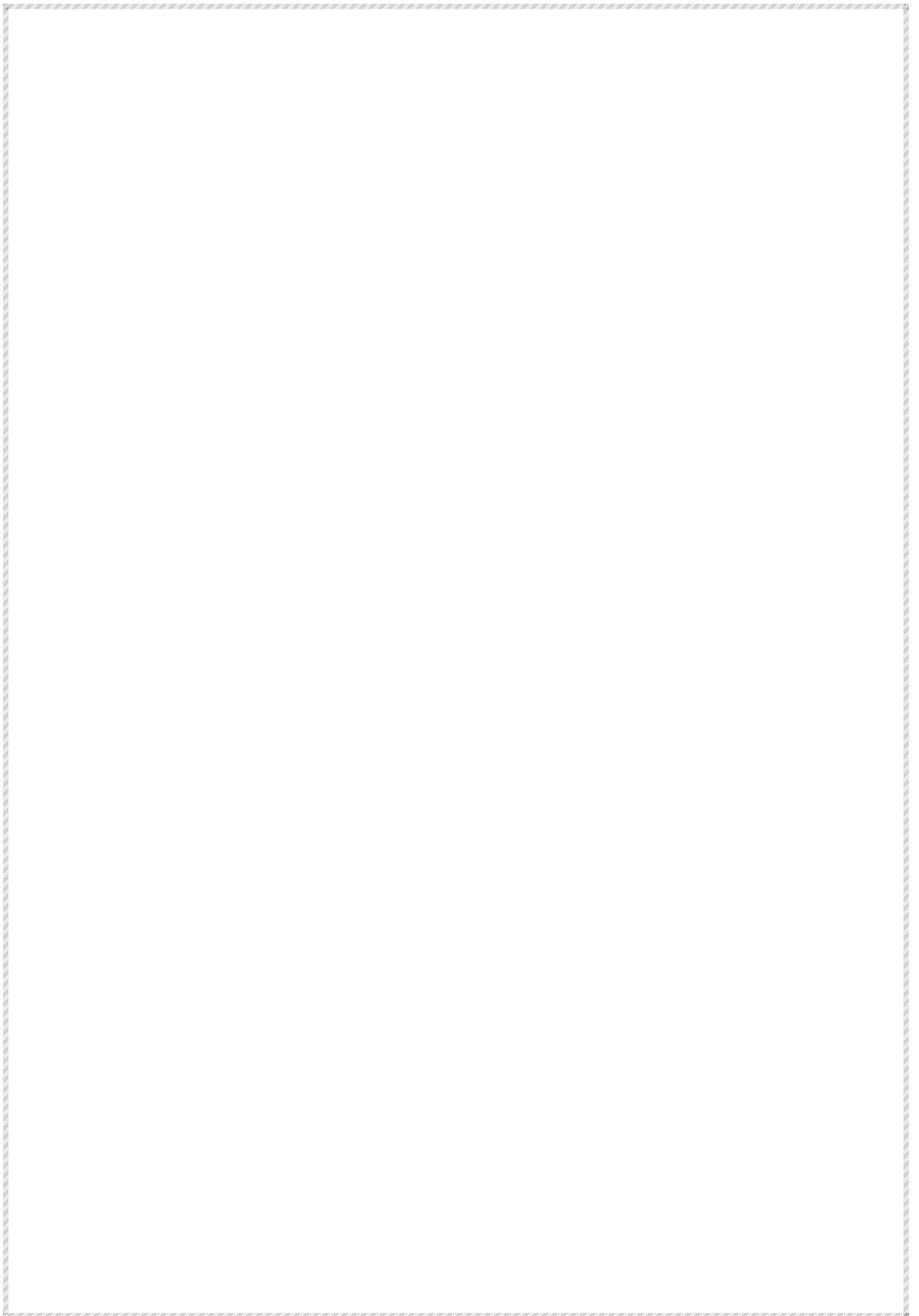
*A mon fiancer Walid.*

*A tous mes chères amis.*

*A ma chère binôme et amie Hayet et à toute sa famille.*

*Et à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin pour que ce projet soit possible, je vous dis merci.*

*HEJIRA*



## Liste des figures

**Figure 1 :** L'appareil génital d'un taureau.

**Figure 2 :** Organisation interne du testicule et de l'épididyme.

**Figure 3 :** Morphologie du spermatozoïde mur.

**Figure 4 :** Les différentes étapes de la spermatogenèse.

**Figure 5 :** Vagin artificiel.

**Figure 6 :** les paramètres de la motilité spermatique.

**Figure 7 :** Système CASA montée sur microscope.

**Figure 8 :** Modifications morphologiques des spermatozoïdes soumis au test hypo-osmotique.

**Figure 9 :** Testicule d'un taureau.

**Figure 10:** Épididyme isolé après dissection.

**Figure 11 :** Sperme épididymaire fraîchement collectée.

**Figure 12 :** un spectrophotomètre visible de marque (VIS 7220 G) de biotech Engineering Management.

**Figure13 :** courbe de point représentant l'évaluation de l'absorbance en fonction de la concentration spermatique.

**Figure 14:** Nuage de points représentant l'évolution de la concentration spermatique mesurée par la cellule de Malassez en fonction de la concentration mesurée par spectrophotométrie.

**Figure15 :** Corrélation entre le % de spermatozoïdes mobiles mesuré par le CASA et l'absorbance à  $\lambda = 550$  nm mesurée par spectrophotométrie.

**Figure16 :** Corrélation entre le % de spermatozoïdes rapides mesuré par le CASA et l'absorbance à  $\lambda = 550$  nm mesurée par spectrophotométrie.

**Figure17** : Corrélation entre la VCL mesurée par le CASA et l'absorbance à  $\lambda = 550$  nm mesurée par spectrophotométrie.

**Figure18** : Corrélation entre la (ALH) mesurée par le CASA et l'absorbance à  $\lambda = 550$  nm mesurée par spectrophotométrie.

## Liste des tableaux

**Tableau 1** : Notation de la mobilité massale dans l'espèce bovine

**Tableau 2** : Les paramètres de la mobilité spermatiques mesurées par le Casa pour chaque spermatozoïde

**Tableau3** : Comparaison entre les concentrations moyennes des échantillons et leurs variations obtenues par la méthode de référence et par spectrophotométrie

**Tableau4** : corrélations ( $r$ ) entre les absorbances obtenues par spectrophotométrie et les pourcentages des différentes catégories de spermatozoïdes mesurés par le CASA et la qualité de la régression linéaire ( $R^2$ ) obtenues pour chaque catégorie

**Tableau5** : corrélations ( $r$ ) entre les absorbances obtenues par spectrophotométrie et les différents paramètres de la mobilité spermatique mesurés par le CASA et les qualités de la régression linéaire ( $R^2$ ) obtenues pour chaque paramètre.



## Introduction

L'évaluation de la qualité de sperme est d'une importance majeure dans l'exploration de l'infertilité masculine et surtout pour l'exploitation des pères génétiquement supérieurs dans les programmes d'insémination artificielle (AI)(Anzar et al. 2009) Le succès de cette dernière dépend en grande partie de la qualité de la semence, c'est pourquoi la précision dans sa mesure est importante et donc il est impératif de se disposer de techniques analytiques fiables et précises.

La mesure de la concentration des spermatozoïdes est un paramètre primordial dans une analyse qualitative de sperme. Sa détermination repose sur le comptage visuel avec un hématimètre qui reste la méthode de comptage la plus répandue (Gbangboche et al. 2012).Cependant, vu le temps et l'effort nécessaire pour l'exécuter, d'autres méthode sont été développées comme les méthodes de comptage automatiques des noyaux rendus fluorescents par le bromure d'ethidium, la cytométrie en flux et les méthodes spectrophotométriques. Ces méthodes ont généralement une bonne précision et elles permettent de rendre les manipulations plus rapides(Ponthier 2012)..

Bonne concentration élevé des spermatozoïdes ne signifie pas forcément que le sperme est de qualité, une mauvaise mobilité engendre des problèmes énormes de fertilité ce qui rend son analyse obligatoire. La mobilité a longtemps à été déterminée par examen de goutte épaisse sous le microscope optique (méthode subjective)(Ponthier 2012)et par La méthode objective notamment CASA (Computer Assisted Sperme Analysis).

Par ailleurs, dans les études qualitatives de sperme, on fait appel aux examens de vitalité qui sont surtout les tests classiques, tels que le test à l'éosine- nigrosine et le test de gonflement flagellaire en milieu hypo-osmotique (HOST) qui permettent d'apprécier le pourcentage de vitalité des spermatozoïdes en spermiologie courante(Forges & Foliguet 2001)

Ainsi, notre travail a pour objectif principal, de comparer les résultats et la précision des méthodes d'analyse de la qualité de sperme bovin suivant : Pour la concentration (la méthode de référence par hématimètre de Malassez vs la méthode spectrophotométriques), pour la mobilité (la méthode CASA vs la méthode spectrophotométriques) et pour la vitalité (la méthode de coloration éosine-nigrosine vs la méthode HOST et le test à l'eau) et également, pour optimiser les protocoles des méthodes utilisées localement au sein du laboratoire

Ce travail sera présenté en deux parties :

La première partie est une synthèse bibliographique dans laquelle des rappels anatomophysiologicals de l'appareil reproducteur mâle et la technologie de la semence bovine seront abordés. La deuxième représente la partie expérimentale comprenant la méthodologie de travail, la présentation et discussion des résultats ainsi que les perspectives.

## Chapitre 1 : La reproduction chez les bovines

### I. Rappels anatomiques sur l'appareil génital du taureau

L'appareil génital du taureau (figure1) 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

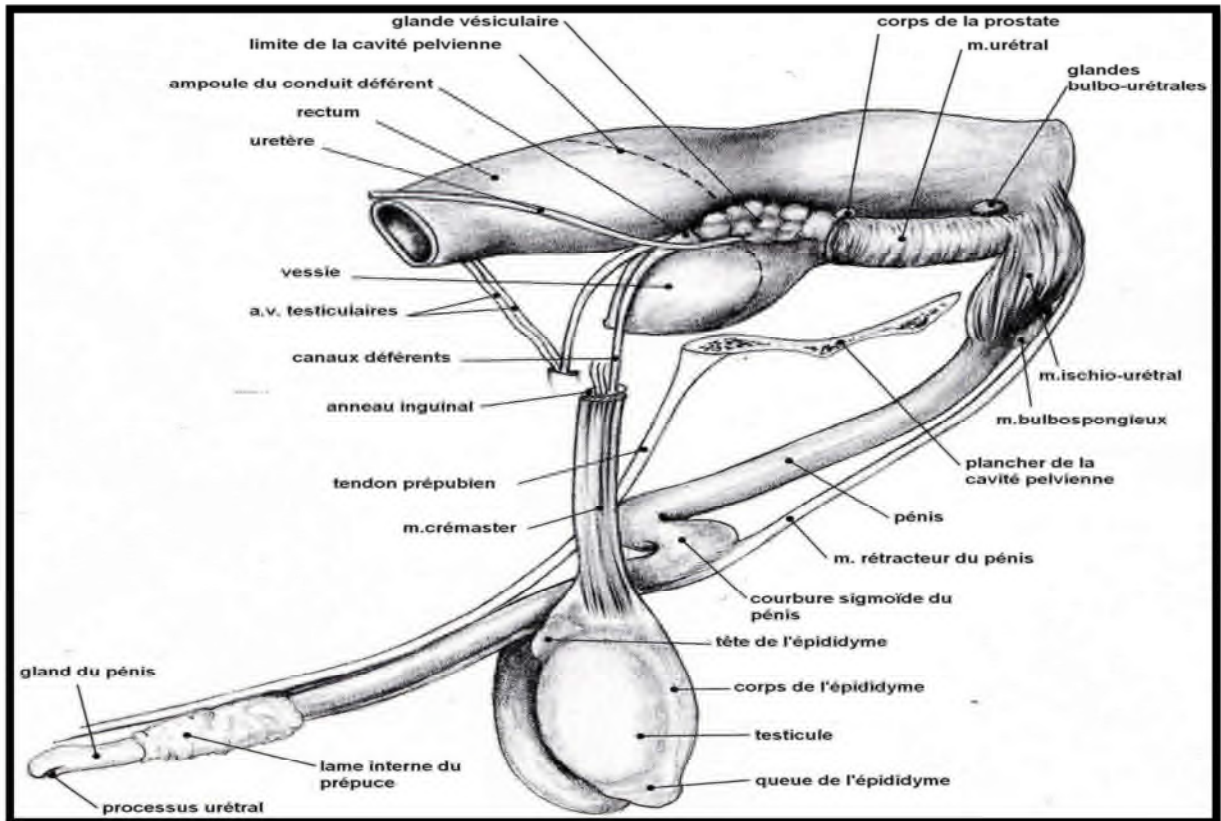


Figure 1 : L'appareil génital d'un taureau (Rigal 2008)

#### I.1. Partie glandulaire

##### 1.1. Les testicules

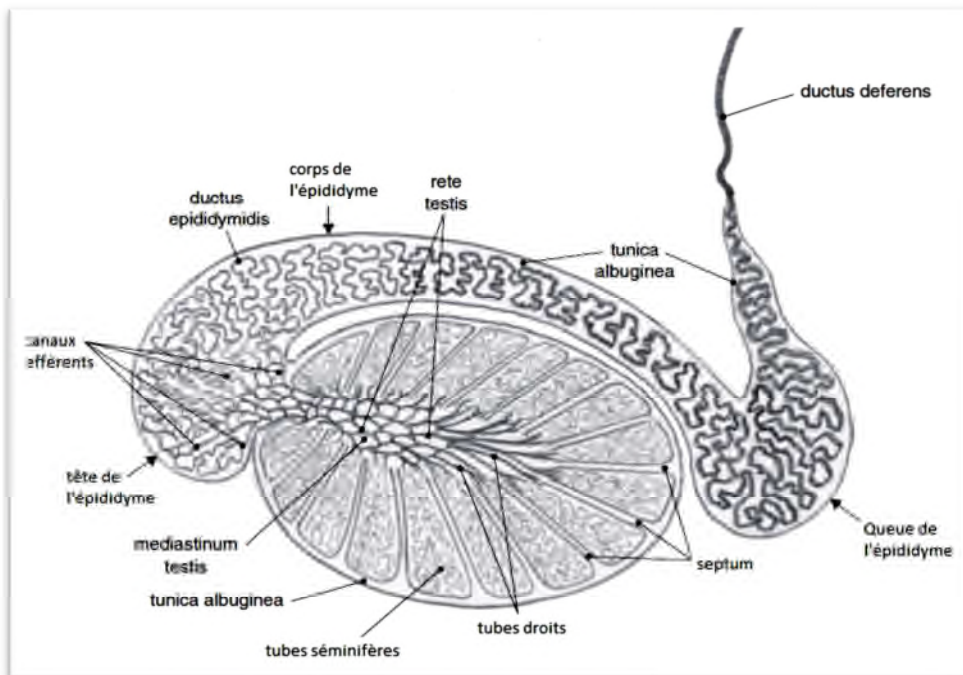
Les testicules (figure 2) sont des organes pairs, ils assurent une double fonction : une fonction exocrine avec la production de spermatozoïdes ou spermatogénèse et une fonction endocrine avec la production des hormones mâles. Ils sont logés avec l'épididyme dans la tunique vaginale et le scrotum. Chez le taureau, la descente des testicules dans les enveloppes testiculaires s'effectue avant la naissance, vers 3 à 4 mois de gestation. Le testicule est pendulaire, à axe vertical et pèse approximativement 500 grammes vers deux ans. Il mesure

alors en moyenne 11 à 15 cm de haut sur 7 à 9 cm de large, et 7 à 9 cm d'épaisseur pour une circonférence scrotale de 35 cm selon (Setchell, 1991) cité par.(Rigal 2008)

### ***1.2. Enveloppes testiculaires***

Les enveloppes testiculaires, encore appelées bourses, sont formées par un ensemble de six membranes. Il y a deux membranes superficielles constituées par le scrotum et le dartos, trois membranes en profondeur formées par le crémaster, la fibreuse et la séreuse vaginale, en fin la tunique celluleuse et les ligaments qui stabilisent les testicules dans leurs enveloppes.

Les enveloppes testiculaires soutiennent et protègent les testicules, les voies spermatiques qui leur sont accolées (épididyme, canal déférent) et les vaisseaux sanguins qui les irriguent. Cependant, leur principal rôle est d'assurer la thermorégulation des testicules, essentielle au bon déroulement de la spermatogénèse(Konfe 2014).



**Figure 2 :Organisation interne du testicule et de l'épididyme (Schlatter, 2007)cité par (Marc 2015)**

### **I.2. Partie excrétrice**

#### ***2.1. Les voies spermatiques***

##### **2.1.1. L'épididyme**

Est un corps allongé le long du bord postérieur du testicule auquel il fait suite chez les ruminants. Il est constitué d'un épithélium stratifié et de nombreuses stériocils. L'épididyme

est composé de trois parties que sont : la tête, le corps et la queue. Chez le taureau, la durée du transit épидидymaire des spermatozoïdes est de 9 à 13 jours, il stocke les spermatozoïdes où ils subissent une maturation (Konfe 2014).

### **2.1.2. Le canal déférent**

Il fait suite au canal épидидymaire et s'élargit en une ampoule différentielle qui s'abouche à l'urètre contiguïté de la vésicule séminale(Konfe 2014).L'ampoule du canal déférent chez le taureau une longueur de 10 à 15 cm et une largeur de 5 à 8 mm. Le canal déférent joue également un rôle physiologique assez semblable à celui du canal épидидymaire.(Hanzen 2010)

### **2.1.3 Les tubes séminifères**

Ils sont le siège de la spermatogenèse. Ils sont environ au nombre de 500 (1 à 4 par lobule) mesurant 1 à 3 m de long et 200 à 300 de diamètre. Des amas de grosses cellules :les cellules de Leydig ou cellules interstitielles. Elles sont situées entre les tubes et produisent une hormone : la testostérone.

## **2.2. Les voies urogénitales**

### **2.2.1. L'urètre**

Est un canal impair allant de la vessie au méat urinaire et servant de passage pour le sperme lors de l'éjaculation et l'urine pendant la miction. La longueur de l'urètre peut atteindre 100 à 120 cm chez un taureau adulte. Il comporte deux parties que sont : l'urètre pelvien situé dans la cavité pelvienne et l'urètre pénien situé dans le pénis. Chez le taureau, l'urètre a la particularité de présenter un trajet en S : c'est le pénis. Il contribue à l'allongement du pénis lors de l'érection(Konfe 2014).

### **2.2.2. Le pénis**

Représente l'organe copulateur du taureau. Sa longueur varie selon les races et peut atteindre 80 à 110 cm de long. Il se forme par tabulation et élongation du tubercule génital. Le pénis comprend trois parties : la racine du pénis, le corps du pénis et l'extrémité libre du pénis. Il est irrigué par les artères caverneuses et les artères dorsales de la verge et le sang est repris par les veines honteuses externes. Le pénis est recouvert (protégé par un étui cutané, le fourreau encore appelé prépuce riche en glandes sécrétrices de phéromones (Konfe 2014).

### **2.2.3. Les glandes annexes**

Les glandes annexes ou glandes sexuelles accessoires présentent chez les mammifères de grandes variations anatomiques et physiologiques. Chez le taureau, les trois glandes sont : les glandes vésiculaires ou vésicules séminales, la prostate et les glandes bulbo-urétrales. La vessie et les glandes annexes (Rigal 2008).

Elles sécrètent le liquide séminal qui se déverse dans les voies excrétrices lors de l'éjaculation et se mélange aux spermatozoïdes pour former le sperme. (Konfe 2014).

### **2.3. Les vésicules séminales**

*Organes pairs symétriques, à la surface bosselée situés en arrière du col de la vessie au dessus de la prostate (Kohler 2011), mesurent 2/5 cm de long, 1,5 cm de large, se sont les glandes produisant le liquide séminal dans lequel nage les spermatozoïdes.*

### **2.4. La prostate**

La prostate est une glande de l'appareil génital masculin qui a la forme et la taille d'une châtaigne et pèse 15 à 25 g à l'âge adulte. Située en avant Organisation du rectum, la prostate entoure le col de la vessie et la partie initiale de l'urètre, le canal qui permet l'évacuation des urines et du sperme (figure 1a). Elle comprend trois zones principales: la zone centrale, la zone de transition et la zone périphérique. (Dayon 2008).

### **2.5. Les glandes bulbo-urétrales (les glandes de Cowper)**

Les glandes bulbo-urétrales, appelées également glandes de Cowper, sont paires et situées de chaque côté de la face dorsale de la partie pelvienne de l'urètre, tout près du bulbe du pénis. Elles sont absentes chez le chien, très petites chez le chat et de dimensions relativement faibles chez le taureau (Marc 2015).

## **II. Physiologie de l'appareil reproducteur de taureau**

### **II.1. Puberté**

La puberté chez le mâle correspond au moment où des spermatozoïdes matures sont libérés dans l'éjaculat. Des changements morphologiques peuvent être notés chez le mâle quelques semaines avant l'apparition des spermatozoïdes fertiles dans l'éjaculat. Selon Bearden et al. (2004) cité par (Cabannes 2008), on observe des changements de la conformation corporelle, une augmentation de l'agressivité envers les autres mâles, une augmentation de la libido ainsi qu'une croissance rapide du pénis et des testicules. Chez le

taureau, la puberté est plus tardive pour les races allaitantes que pour les races laitières. En moyenne, la puberté apparaît entre 10 et 12 mois . L'évaluation de la fonction sexuelle des futurs taureaux reproducteurs intervient à l'âge de 12 mois environ. Les taureaux sont évalués sur la qualité de l'éjaculat ainsi que sur la circonférence scrotale. La capacité reproductrice et la production de semence sont maximales aux alentours de 4 ans(Cabannes 2008)

## II.2. La production du sperme

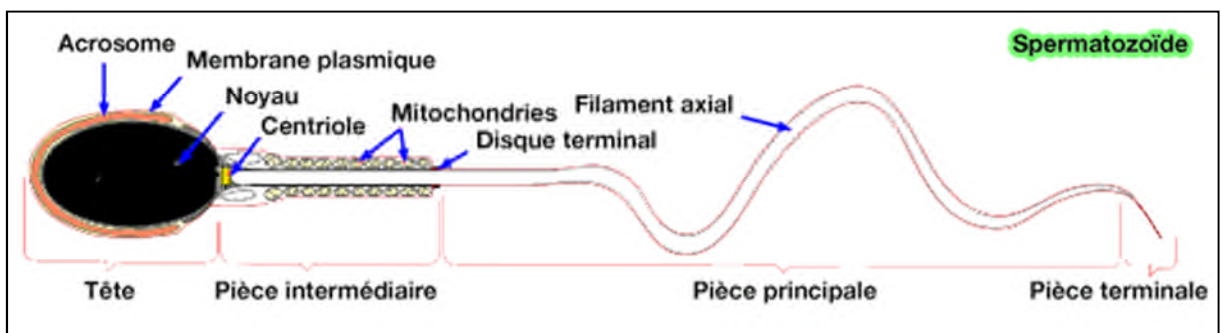
### 2.1. Le sperme

Le sperme est un liquide opaque, blanchâtre produit au cours de l'éjaculation. Il est composé de spermatozoïdes en suspension dans le liquide séminal qui est un mélange des sécrétions des différentes glandes génitales mâles (prostate, vésicule séminale.). Les spermatozoïdes représentent 20% et le liquide séminal 80% du liquide spermatique(Konfe 2014).

### 2.2. Le Spermatozoïde

Le spermatozoïde (figure3) est une cellule hautement spécialisée qui ne grossit plus et ne se divise plus. Sa taille varie entre 50 à 80  $\mu\text{m}$  chez le taureau. Le spermatozoïde comporte trois principales parties qui sont :

- La tête, partie essentielle, est presque exclusivement constituée d'un noyau haploïde et coiffé de l'acrosome.
- La pièce intermédiaire, elle est riche en mitochondries et en enzymes propre aux métabolismes du spermatozoïde.
- Le flagelle, ses mouvements favorisent le déplacement du spermatozoïde.



**Figure 3 : Morphologie du spermatozoïde mur (source :**

<https://www.google.com/search?q=la+morphologie+du+spermatozoïde+mûr> ; consultée le

05/05/2017

### 2.3. La spermatogénèse

La spermatogénèse (figure4) correspond à un processus de différenciation cellulaire qui aboutit à la production des spermatozoïdes à partir des spermatogonies souches. Elle commence à la puberté. La production des spermatozoïdes est continue au cours de la vie de l'animal et nécessite la prolifération des spermatogonies souches par mitose. L'entrée des spermatogonies souches dans le processus de spermatogénèse 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 spermatocytes (diploïdes).

La spermatogonie 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. La durée de la spermatogénèse est d'environ 54 jours chez le taureau. La durée moyenne de transit dans l'épididyme est de 8 jours selon (Hochereauet al., 1964). cité par(Rigal 2008).

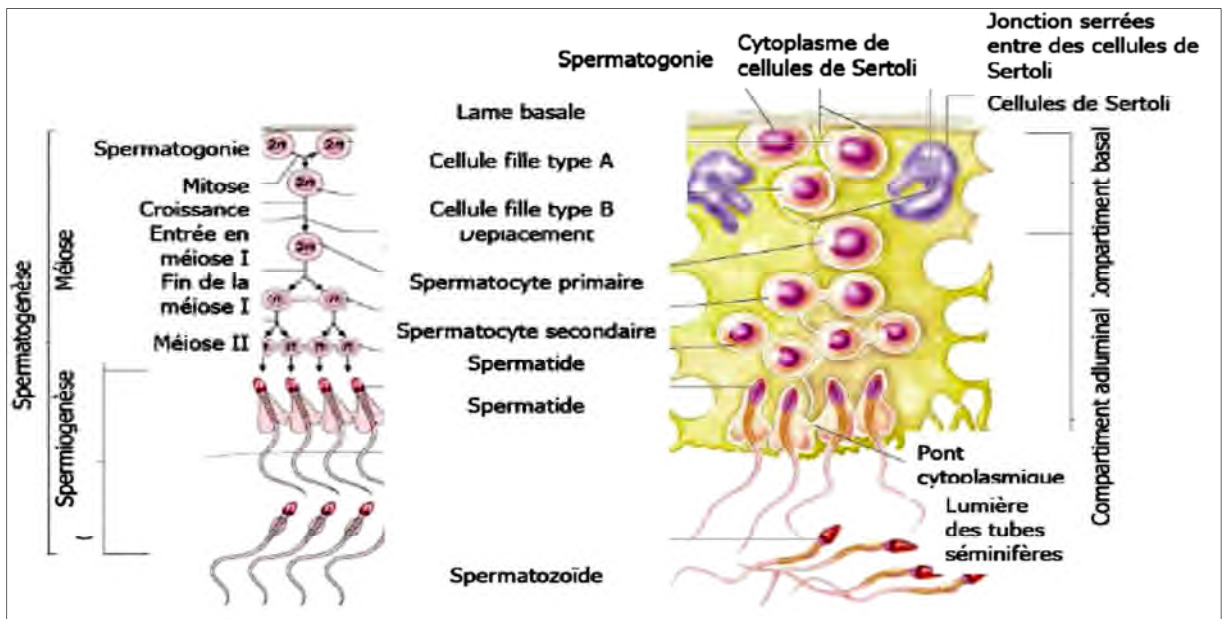


Figure 4 :Les différentes étapes de la spermatogénèse (Senger, 2012) cité par(Marc 2015).



### **II.3. Plasma séminal**

Le plasma séminal est le principal composant du sperme. Il est constitué par les sécrétions des glandes annexes de l'épididyme et des cellules de Sertoli. Il renferme des constituants inorganiques et divers constituants organiques(Konfe 2014)

Le rôle majeur du liquide séminal est l'apport de substrats énergétiques aux spermatozoïdes qui en étaient largement dépourvus lors de leur stockage dans l'épididyme. De plus, la dilution des gamètes dans le plasma séminal permet l'activation de leur motilité progressive ainsi qu'un transfert facilité des spermatozoïdes dans le tractus génital femelle lors de l'éjaculation . Les sécrétions des glandes annexes constituent la majeure partie de la fraction liquide de l'éjaculat, de 50 à 95% du volume total du liquide séminal suivant les espèces. Certains éléments du liquide séminal proviennent de la filtration du plasma sanguin tandis que d'autres sont produits par les glandes sexuelles selon (Dacheux et al. 2001) cité par (Marc 2015).

## Chapitre 2 : Technologie de la semence bovine

### 1. Collecte du sperme

La collecte du sperme est l'ensemble des procédés par lesquels le sperme est recueilli chez un animal vivant. Le sperme est prélevé sur des animaux sains, reconnus indemnes de maladies légalement reconnues contagieuses (MLRC) et de toutes zoonoses (brucellose, tuberculose). Plusieurs techniques de récolte ont été utilisées au fil du temps avec les progrès scientifiques et technologiques. Les unes s'inspirent des conditions naturelles d'accouplement alors que les autres sont le fruit d'investigations expérimentales à la lumière de la physiologie sexuelle selon (BOLY, 1986) cité par (Konfe 2014).

#### 1.1. Collecte du sperme à l'aide du vagin artificiel

La collecte du sperme à l'aide du vagin artificiel (figure5) constitue la technique la plus utilisée dans le monde au niveau de l'espèce bovine. C'est un procédé de récolte qui se rapproche le plus des conditions naturelles d'éjaculation (BOLY, 1986). Elle permet de simuler les conditions naturelles offertes par le vagin de la vache.



**Figure 5 : Vagin artificiel**(Hanzen 2009)

#### 1.2 Electro éjaculation

L'électro éjaculation s'accomplit par stimulation électrique des muscles lisses de l'ampoule et du canal déférent à l'aide d'une sonde intra-rectale et d'une source électrique avec contrôle de la tension. Elle permet de prélever le sperme à partir du taureau sans intervention des mécanismes normaux, sensoriels et psychiques de l'éjaculation(Kabera 2008).

### **1.3. La collecte du sperme épидидymaire**

On peut prélever du sperme épидидymaire d'un animal vivant sous anesthésie générale avec une intervention chirurgicale. Le principe consiste à une microponction du canal déférent.

L'utilisation du sperme épидидymaire est une nouvelle technique utilisable dans le cadre de l'insémination artificielle ou de la fécondation in vitro chez les bovins. La collecte de sperme épидидymaire permet le recueil de spermatozoïdes en nombre suffisant pour plusieurs dizaines d'inséminations artificielles selon (Guérin et al.,2003) cités par (Belkadi et al. 2013)

#### ***La méthode (rétrograde-flushing)***

Les parties caudales et les canaux déférents sont isolés du reste de l'épididyme en faisant une coupe avec un scalpel près de la jonction du corps et de la partie proximale, ensuite, une aiguille est introduite dans la lumière du canal déférent. Le fluide spermatique est alors rincé avec une seringue chargée 4ml d'une solution isotonique chauffée à 37°C dans une direction rétrograde en allant du canal déférent vers la partie caudale.

## **2. Analyse de la qualité du sperme récolté**

Elle consiste à apprécier les caractéristiques du sperme collecté, notamment celles en relation avec le pouvoir fécondant et les technologies de conditionnement. L'examen sémiologique de l'éjaculat comprend un examen visuel (macroscopique), un examen microscopique et une évaluation par test métabolique ou test de résistance (Konfe 2014)

### **2.1. Examens macroscopique**

#### ***2.1.1. Volume de l'éjaculat***

Le volume du sperme collecté varie selon l'espèce, et pour une même espèce donnée, il est fonction de l'état physiologique de l'individu, de l'âge, de la saison, de la race, de la méthode de récolte ou encore des conditions sanitaires et alimentaires. Le volume du sperme est également influencé par des facteurs psychiques et environnementaux selon (Parez et Duplan, 1987)cité par(Konfe 2014)

#### ***2.1.2. La Couleur de l'éjaculat***

Le sperme normal de taureau est de couleur blanchâtre selon (Parez et Duplan, 1987)cité par(Konfe 2014).. Cette couleur peut être cependant modifiée pour des raisons d'ordre physiologiques et surtout pathologiques. La couleur jaune du sperme est due à une teneur élevée en carotène provenant des vésicules séminales. Elle peut également résulter de

la présence de pus ou d'urine dans le sperme. Une coloration rosâtre ou rougeâtre traduit la présence de sang dans le sperme. La coloration brunâtre traduit la présence de sang altéré ou d'éléments sanguins dégénérés dans le sperme ou une inflexion. La couleur bleue de l'éjaculat est due à une faible concentration en spermatozoïdes ou l'administration de bleu de méthylène (Konfe 2014).

### ***2.1.3. La Viscosité***

La viscosité du sperme est fortement tributaire de la concentration en spermatozoïdes. L'éjaculat est d'autant plus visqueux que le nombre de spermatozoïdes est élevé. Comparé à l'eau distillée, le sperme normal de taureau a une viscosité de 3,7selon (Parez et Duplan, 1987)cité par(Konfe 2014).

### ***2.1.4. Le pH du sperme***

Le pH du sperme est mesuré à l'aide d'un pH-mètre ou à l'aide du papier indicateur. C'est une mesure qui se fait immédiatement après la récolte. En effet le sperme s'acidifie rapidement par formation d'acide lactique. Le pH du sperme normal est compris entre 6,5 et 6,8chez le taureau selon (Hanzen, 2009)cité par (Konfe 2014).

### ***2.1.5.Le poids spécifique***

Le poids spécifique du sperme dépend du rapport entre la concentration en spermatozoïdes et le volume du plasma séminal. Il est de 1.035 chez le taureau(Konfe 2014).

## **2.2. Examen microscopique**

### ***2.2.1. Motilité massale***

L'examen de la motilité massale est effectué le plus rapidement possible après le prélèvement du sperme en le maintenant rigoureusement à une température voisine de 38°C, car elle diminue très rapidement. Les spermatozoïdes se déplacent habituellement de manière rectiligne. La motilité massale dépend essentiellement de trois facteurs : la concentration, le pourcentage de spermatozoïdes mobiles et de la vitesse de déplacement des spermatozoïdes. Chez le taureau, la motilité massale est affectée d'une note variant de 0 à 5(tableau1) selon (Parez et Duplan, 1987)cité par(Konfe 2014).

**Tableau 1** : Notation de la mobilité massale dans l'espèce bovin

| Note | Pourcentage approximatif | Nature du mouvement                         |
|------|--------------------------|---|
| 0    | 0%                       | Aucun mouvement en surface                  |
| 1    | 20%                      | Léger mouvement à la surface                |
| 2    | 40%                      | Mouvement net mais ne formant pas de vagues |
| 3    | 60%                      | Début de vagues                             |
| 4    | 80%                      | Vagues très nettes                          |
| 5    | 100%                     | Tourbillons nettement visibles              |

### ***2.2.2.La motilité individuelle***

Est mesurée au microscope optique à un agrandissement 200x entre lame et lamelle, elle correspond à la proportion de spermatozoïdes avec un mouvement rectiligne qui traversent le champ du microscope. Les spermatozoïdes bougeant sur place, tournant en petits cercles ou se déplaçant en arrière du fait d'une queue repliée ne sont pas considérés comme mobiles selon (Gérard et Khirredine, 2002) cité par (Rigal 2008)

### ***2.2.3.Mesure objective de la mobilité spermatique par analyseur informatique du sperme (CASA)***

#### **a. Notion de CASA**

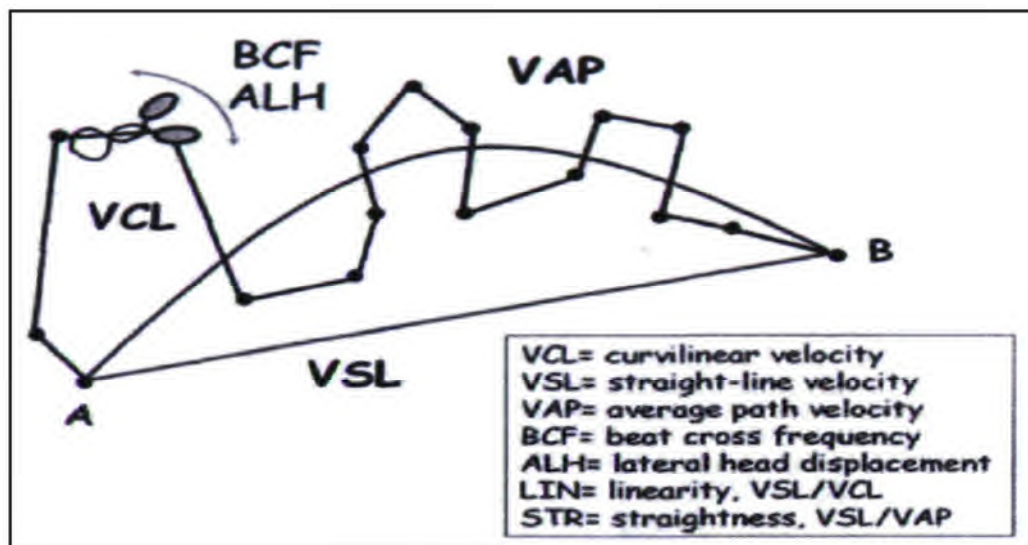
CASA (figure7) est l'acronyme de « Computer-Assisted Semen Analysis » en Anglais qui peut se traduire en français par système informatisé d'analyse de sperme. Il constitue un outil qui est de plus en plus intégré dans les laboratoires de biologie médicale, permettant la réalisation de spermogrammes. Cet appareil facultatif est surtout utile dans les centres effectuant un grand volume d'analyses ou les centres spécialisés de fertilité(OPTMQ 2016)

Les systèmes CASA sont constitués d'un microscope optique, d'une caméra et d'un processeur (ordinateur). Les plus récents appareils permettent la mesure et le calcul de nombreux paramètres du spermogramme : la motilité, la concentration des spermatozoïdes, les caractéristiques morpho métriques (telle la longueur, la largeur, le périmètre et surface de la tête, la longueur du flagelle) et les anomalies morphologiques (flagelle enroulé, cassé, vacuoles).

## b. évaluation de la mobilité à l'aide du CASA

Les méthodes CASA ont permis de standardiser les examens de mobilité totale et progressive dans un même laboratoire et de caractériser le sperme au moyen de plusieurs paramètres. L'analyse au CASA demande d'utiliser une concentration basse, cette analyse est validée si la machine utilise entre 700 et 900 cellules, ce qui correspond à une concentration comprise entre 20 et 30 x 10<sup>6</sup> spz/ml pour la plupart des analyseurs (Ponthier 2012).

Le système détecte les mouvements des spermatozoïdes, et suit chaque spermatozoïde séparément dans le temps et l'espace. En pratique, on place un échantillon sur une cellule qui ne doit pas être trop profonde pour ne pas gêner la mise au point du microscope (12 µm). Une caméra enregistre tous les mouvements et les analyses selon divers paramètres (voir Figure 6) notamment la mobilité (MOT), la vitesse linéaire (VSL : Velocity Straight Line), la vitesse curviligne (VCL : Velocity Curvie Line), la linéarité (LIN=VSL/VCL), le déplacement de la tête (ALH : Amplitude of Lateral Head Displcement)(Salson 2008).



**Figure 6** : les paramètres de la motilité spermatique (Illustration de la vélocité curvilinéaire (VCL), la vélocité linéaire (VSL), la vélocité moyenne du trajet (VAP), l'amplitude du déplacement latéral de la tête (ALH) et la fréquence à laquelle la tête traverse le point milieu de la trajectoire (BCF))(Hebert.A 2011)



**Figure 7 :** Système CASA montée sur microscope(OPTMQ 2016)

### ***2.2.3. Concentration du sperme***

La concentration exprime le nombre de spermatozoïdes par  $\text{mm}^3$  (ou par ml) d'un éjaculat. Elle peut être directement déterminée par comptage des spermatozoïdes au moyen d'une cellule hématimétrique ou indirectement par comparaison visuelle du sperme à des solutions standards par comptage électronique ou encore par néphélométrie. L'évaluation de la concentration en spermatozoïdes par la méthode directe permet d'avoir un résultat plus objectif .

#### **a. Méthode de référence (par hématimètre)**

Exemple de formule de mesure de la concentration sur :

##### **Hématimètre de Thoma(voir Annexe):**

$$\text{Concentration}(\text{spermatozoïdes/ml}) = N \times 4 \times D \times 10\,000$$

- N représente le nombre de spermatozoïdes comptés dans 4 grands carrés.
- 4 puisque l'hématimètre comporte 16 grands carrés d'une surface totale égale à  $1\text{mm}^2$
- D correspond au degré de dilution.
- 10000 puisque le volume de la cellule de Thoma est de  $0.1\ \mu\text{l}$  donc, pour avoir le nombre de spermatozoïdes /ml, il faut multiplier par 10 000.

##### **Hématimètre de Malassez (voir Annexe) :**

$$\text{Concentration} (\text{spermatozoïdes/ml}) = N \times 2 \times 100 \times D \times 1000$$

- N représente le nombre de spermatozoïdes comptés dans 10 petits carrés d'un rectangle subdivisé (périmètre de comptage).
- 2 puisque un périmètre de comptage comporte 20 petits carrés.
- 100 puisque le nombre de rectangles de la cellule de Malassez est de 100
- D correspond au degré de dilution (l'inverse du taux de dilution)
- 1000 puisque le volume de la cellule de Malassez est de  $1 \text{ mm}^3$  donc, pour avoir le nombre de spermatozoïdes /ml, il faut multiplier par 1000.

#### **b. La concentration en spermatozoïdes par le spectrophotomètre**

Est mesurée en milliards de spermatozoïdes par millilitre à l'aide d'un spectrophotomètre étalonné. Cet appareil mesure la densité optique du sperme dilué (40  $\mu\text{l}$  de sperme dans 960  $\mu\text{l}$  de sérum physiologique, il est réglé sur une longueur d'onde de 550 nm (Rigal 2008).

#### *Notion de spectrophotométrie*

La spectrophotométrie est une méthode analytique quantitative et qualitative qui consiste à mesurer l'absorbance ou la densité optique d'une substance chimique donnée, généralement en solution. Plus l'échantillon est concentré, plus il absorbe la lumière dans les limites de proportionnalité énoncées par la loi de Beer-Lambert.

#### **❖ Loi de Beer-Lambert**

L'expérience montre que pour une solution peu concentrée en substance absorbante, l'absorbance  $A(\lambda)$  est proportionnelle à la longueur de la cuve  $\ell$  et à la concentration  $c$  de la substance absorbante, ce que traduit la loi de Beer-Lambert :  $A(\lambda) = \varepsilon(\lambda) \cdot \ell \cdot c$

#### *Principe de la spectrophotométrie*

Un spectrophotomètre mesure l'absorbance d'une solution à une longueur d'onde donnée. Dans la pratique, l'appareil réalise une mesure de l'intensité de la lumière après son passage au travers d'une cuve contenant la solution à étudier. L'intensité de la lumière monochromatique émise ( $I_0$ ) est connue. À partir de la mesure de l'intensité de la lumière transmise ( $I$ ), l'appareil donne l'absorbance ( $A$ ) selon la formule suivante :  $A = \log(I_0/I)$ .



#### 2.2.4. Analyse de la vitalité

##### 4.1. Par le test à éosine-nigrosine

L'évaluation de la vitalité repose sur le principe de la perméabilité de la membrane du spermatozoïde mort. La tête du spermatozoïde mort devient rose ou rouge quand on la colore à l'éosine-nigrosine, tandis que le spermatozoïde vivant ne prend pas le colorant et reste blanc(encolleur). La moyenne des résultats obtenue avec les deux échantillons est exprimée en pourcentage de spermatozoïdes vivants dans le rapport.

##### 4.2. Par Le test hypo-osmotique

Le test hypo-osmotique (figure8) ou HOST permet d'évaluer l'intégrité membranaire des cellules. En effet, les cellules présentant une membrane plasmique intacte ont la capacité de se déformer et d'évacuer l'eau. Lorsque la cellule est exposée à des conditions hypo-osmotiques, l'eau va pénétrer dans le milieu intracellulaire jusqu'à ce que l'équilibre osmotique soit atteint de part et d'autre de la membrane. La cellule va donc gonfler. Ce phénomène est particulièrement visible au niveau des spermatozoïdes qui vont montrer une incurvation de leur flagelle ou un gonflement de celui-ci selon (Pena Martinez 2004)cité par(Marc 2015).

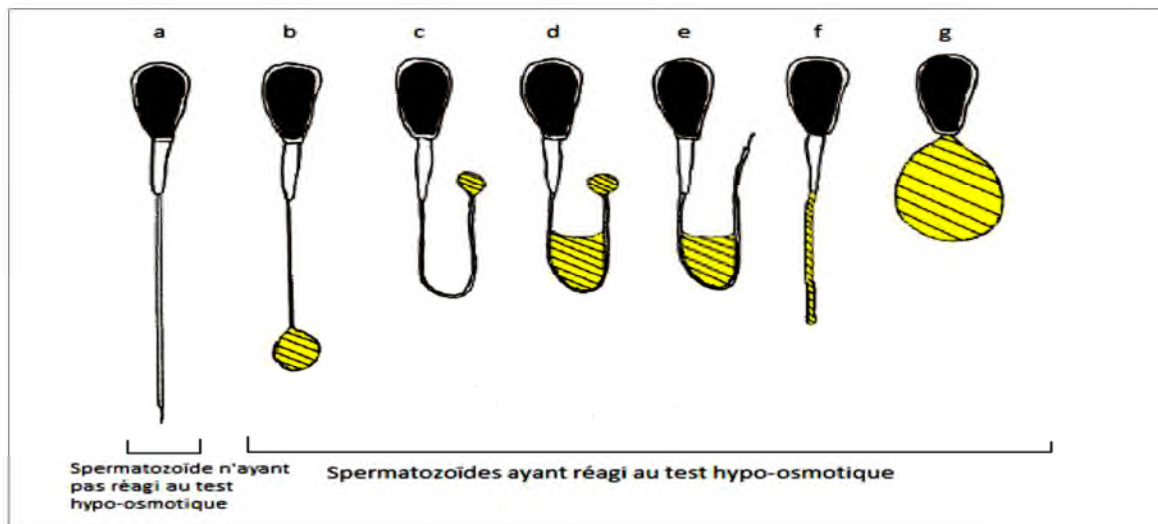


Figure 8 : Modifications morphologiques des spermatozoïdes soumis au test hypo-osmotique [d'après : Jeyendran et al. (1984) cités par (Marc 2015)].

## **I. Matériel et méthodes**

L'objectif de notre travail est de comparer des méthodes d'analyse de la concentration (la méthode de référence par hématimètre vs la méthode spectrophotométrique), de la mobilité (la méthode automatique par analyseur informatique CASA vs spectrophotométrie).

Les 'expérimentations ont été réalisées dans la période allant du 10 au 30 Avril 2017, sur le sperme épидидymaire collecté à partir de 12 testicules de bovins, obtenus de l'Abattoir communal de Bejaia juste après l'abattage.

Les testicules ont été transportés à température ambiante au laboratoire de biologie animale de l'université A. MIRA de Bejaia. La collecte du sperme épидидymaire a été effectuée juste après l'arrivée au laboratoire (environ 30 min après la récupération des testicules).

### **I.1. La collecte du sperme épидидymaire**

#### **I.1.1. Matériel**

Pour collecter le sperme épидидymaire des 12 testicules bovins nous avons utilisé le matériel suivant :

- Une lame de rasoir.
- Une seringue.
- Un épendorff.
- De l'eau physiologique.
- Du papier aluminium.
- Du papier absorbant.
- Et des gants en latex.

#### **I.1.2. Méthode de collecte**

Pour la collecte du sperme épидидymaire nous avons suivie les étapes suivantes :

- Enlever la gaine externe du testicule (l'albuginée) à l'aide d'une lame de rasoir.
- Toujours à l'aide d'une lame de rasoir, isoler soigneusement l'épididyme du testicule.
- Mettre en évidence le canal défèrent de l'épididyme en le débarrassant de la tunique qui l'enrobe.
- Rincer l'épididyme et le canal défèrent avec de l'eau physiologique.

- Réaliser une série de ponction sur la queue épидидymaire, afin de débarrasser celle-ci du sang qui peut contaminer la semence lors de la collecte ;
- Réaliser une incision profonde à l'aide de la lame de rasoir ;
- Placer un épидорff gradué sous l'incision ;
- Introduire une seringue remplie de 1ml de solution physiologique et d'air dans la lumière du canal défèrent.
- Appuyer délicatement sur le piston de la seringue afin de vider l'air et l'eau physiologique de la seringue et créer une pression qui va conduire à l'écoulement de la semence dans l'épидорff.



**Figure 9** : Testicule d'un taureau



**Figure 10**:Épидидyme isolé après dissection



**Figure 11** :Sperme épидидymaire fraîchement collectée

## **I.2. L'analyse du sperme collecté**

### **I.2.1. Analyse de la concentration**

#### ***I.2.1.1. Matériel***

Pour l'analyse de concentration des spermatozoïdes nous avons utilisé le matériel suivant :

- L'analyseur informatique : le logiciel Sperme Class Analyzer (SCA) version 5.4 de l'entreprise Microptic (Barcelone, Espagne) installé sur un microordinateur (Acer, équipé d'un microprocesseur intel pentium dual-core) avec ses accessoires (microscope à contraste de phase de marque Nikon Eclipse E200, caméra numérique de marque Basler et la cellule de makler).
- Le spectrophotomètre visible de marque (VIS 7220 G) de biotech Engineering Management et ses accessoires (cuves) .
- Des micropipettes de 10, 100 et 1000  $\mu$ l et leurs accessoires (embouts) ;
- Des tubes à essai.
- La cellule de comptage (Malassez).

#### ***I.2.1.2. Dilution***

Prélever 15  $\mu$ l de sperme frais et l'ajouter à 2 985  $\mu$ l d'eau distillée (soit un taux de dilution de 1 :200 volume/volume).

#### ***I.2.1.3. La méthode d'analyse***

La concentration de sperme des 12 testicules est obtenue par deux méthodes d'analyse différentes : la méthode de référence (par hématimètre de Malassez) et par spectrophotométrie

##### **I.2.1.3.1. Analyse de la concentration par hématimètre de Malassez**

Pour procéder à cette méthode d'analyse nous avons suivi ces étapes :

- Mouiller légèrement les plateaux de l'hématimètre.
- Poser la lamelle sur les plateaux en appuyant délicatement avec les pouces tout en la faisant légèrement glisser.
- Déposer une goutte de sperme diluée d'une façon inclinée avec la micropipette de 10  $\mu$ m sur les bords de la lamelle.
- Laisser l'hématimètre dans un milieu humide pendant 5 minutes, pour la sédimentation des spermatozoïdes

- Poser l'hématimètre sur la platine du microscope optique et faire la mise au point sur une piscine.
- Compter le nombre des spermatozoïdes dans un demi-rectangle (RM) correspondant à 10 petits carrés (EM) (voir annexe).
- Cette dernière opération est répétée 4 fois pour avoir la moyenne de ci 4 dernier(N). Le nombre N représente la moyenne des nombres de spermatozoïdes trouvés à chaque répétition.
- Et pour ne pas compter deux fois la même cellule qui serait à cheval entre deux carrés (EM), on compte pour chaque carré que les cellules présentes sur le bord supérieur et sur le bord droit.
- Le calcul du nombre des spermatozoïdes par ml se fait par la formule suivante :

$$N \times 2 \times 100 \times 200 \times 1000 = \textit{spermatozoïde /ml}$$

- Le nombre N représente la moyenne des nombres de spermatozoïdes (comptés dans 10 petits carrés d'un rectangle subdivisé (périmètre de comptage)) trouvés à chacune des 4 répétitions.
- 2 puisqu'un périmètre de comptage comporte 20 petits carrés.
- 100 puisque le nombre de rectangles de la cellule de Malassez est de 100
- 200 correspond au degré de dilution (l'inverse du taux de dilution qui est 1/200)
- 1000 puisque le volume de la cellule de Malassez est de 1 mm<sup>3</sup> donc, pour avoir le nombre de spermatozoïdes /ml, il faut multiplier par 1000.

#### **I.2.1.3.2. Analyse de la concentration par spectrophotométrie**

Afin de déterminer la concentration par spectrophotométrie, on a utilisé l'échantillon n° 04 comme solution-mère. La concentration de cette échantillon a été mesurée par la méthode de référence (par hématimètre de Malassez) comme elle a été décrite ci-dessus.

A partir de cette solution-mère, 5 solutions-filles(SF) ont été réalisées set dilués avec l'eau distillée, avec les taux de dilutions suivants : 1 :3.5 (SF1) ; 0.5 :3.5 (SF2) ; 0.25 :3.5 (SF3) ; 1 :35 (SF4) et 0.5 :35 (SF5).

Les concentrations des solutions-filles ont été calculées en utilisant la formule :  $C_{SM} \times V_{SMP} = C_{SF} \times V_{SF}$

Les absorbances de ses solutions-filles ainsi que celle de la solution-mère ont été mesurées par spectrophotométrie à  $\lambda = 550$  nm.

Une courbe d'étalonnage ( $A = f(C)$ ) a été réalisée à l'aide du logiciel Excel 2016 de Microsoft et la formule de la courbe de tendance de cette courbe d'étalonnage a été utilisée pour calculer les concentrations des échantillons après avoir mesurer leurs absorbances à l'aide du spectrophotomètre.

### **I.2.2. Analyse de la mobilité**

Nous avons analysé la mobilité des spermatozoïdes des 12 testicules bovins par deux méthodes différentes : par spectrophotométrie et par analyseur informatique (CASA).

#### ***I.2.2.1. Matériel utilisé***

- Spectrophotomètre (décrit précédemment) .
- L'analyseur informatique (CASA) (décrit précédemment)
- Micropipettes de 10, 100 et 1000  $\mu$ l et leurs accessoires (embouts) ;
- Papier absorbant ;
- Tubes à essai étiquetés ;

#### ***I.2.2.2. Les produits utilisés***

- Le sperme fraîchement collecté.
- Du plasma de vaches gestantes comme diluant biologique du sperme
- La solution physiologique (Na Cl 0.9%)

#### ***I.2.2.3. Dilution du sperme et du plasma***

##### **a. Dilution du sperme**

Le sperme a été dilué avec un taux de 1 : 20<sup>e</sup> (volume/volume) de la manière suivante : 125  $\mu$ l de sperme frais ont été ajoutés dans 2375  $\mu$ l de solution physiologique pour obtenir 2500  $\mu$ l de sperme diluée

##### **b. Dilution du plasma**

Le plasma a été dilué avec un taux 1 :10<sup>e</sup> (volume/volume) de la manière suivante : 100  $\mu$ l du plasma ont été ajoutés à 900  $\mu$ l de solution physiologique pour obtenir 1000  $\mu$ l de plasma dilué

### c. Coincubation du plasma et du sperme dilué

Le plasma et le sperme préalablement dilués ont été coincubés avec un taux de 1 :3,5 (volume/volume) de la manière suivante : 1000 µl de plasma dilué ont été ajoutés dans 2500 µl des spermés dilués pour obtenir un volume total de 3500 µl de sperme coincubé.

Le même sperme coincubé avec le plasma a été utilisé pour l'analyse de la mobilité à l'aide des deux méthodes à comparer (analyse informatique par CASA et par spectrophotométrie).

#### *1.2.2.4. Analyse de la mobilité par l'analyseur CASA*

Après agitation, 10 µl de sperme coincubé ont été placés au centre de la cellule de Makler et après avoir mis la lamelle de couverture, la cellule de Makler a été placée sur la platine du microscope. Après avoir fait la mise au point au grossissement 100X, une analyse de la mobilité a été lancée à T0 (juste après la coincubation).

Les paramètres de la mobilité ont été ainsi enregistrés pour chaque spermatozoïde de chaque échantillon. Les paramètres enregistrés ont été les suivants :

VCL, VSL, VAP, LIN, STR, WOB, ALH et BCF dont les définitions sont données dans le tableau suivant :

**Tableau2** :Les paramètres de la mobilité spermatisques mesurées par le CASA pour chaque spermatozoïde

| Paramètre | Signification  |
|-----------|--|
| VCL       | Vélocité curvilinéaire (µm/s)  |
| VSL       | Vélocité linéaire (µm/s)   |
| VAP       | Vélocité moyenne du trajet (µm/s)  |
| LIN       | Linéarité de la trajectoire curviligne(rapport VSL/VCL) (%)                                |
| STR       | Rectitude ou de linéarité de la trajectoire moyenne (VSL / VAP) (%)                        |
| WOB       | Oscillation de la trajectoire réelle par rapport à la trajectoire moyenne. (VAP / VCL) (%) |
| ALH       | Amplitude du déplacement latéral de la tête (µm)   |
| BCF       | Fréquence à laquelle la tête traverse le point milieu de la trajectoire (hz)               |

#### ***1.2.2.5. L'analyse de la mobilité par le spectrophotomètre***

Dans cette partie nous avons voulu savoir si la spectrophotométrie (figure12) est capable de détecter des variations de la mobilité des spermatozoïdes. L'absorbance de chacun des 12 échantillons coincubés a été ainsi mesurée.

Etant donné que la concentration est la même dans le temps et que seule la qualité de la mobilité varie, on devrait voir une variation des valeurs de l'absorbance en fonction de la mobilité.



**Figure 12 :** un spectrophotomètre visible de marque (VIS 7220 G)de biotech Engineering Management.



## **II. Résultats et discussion**

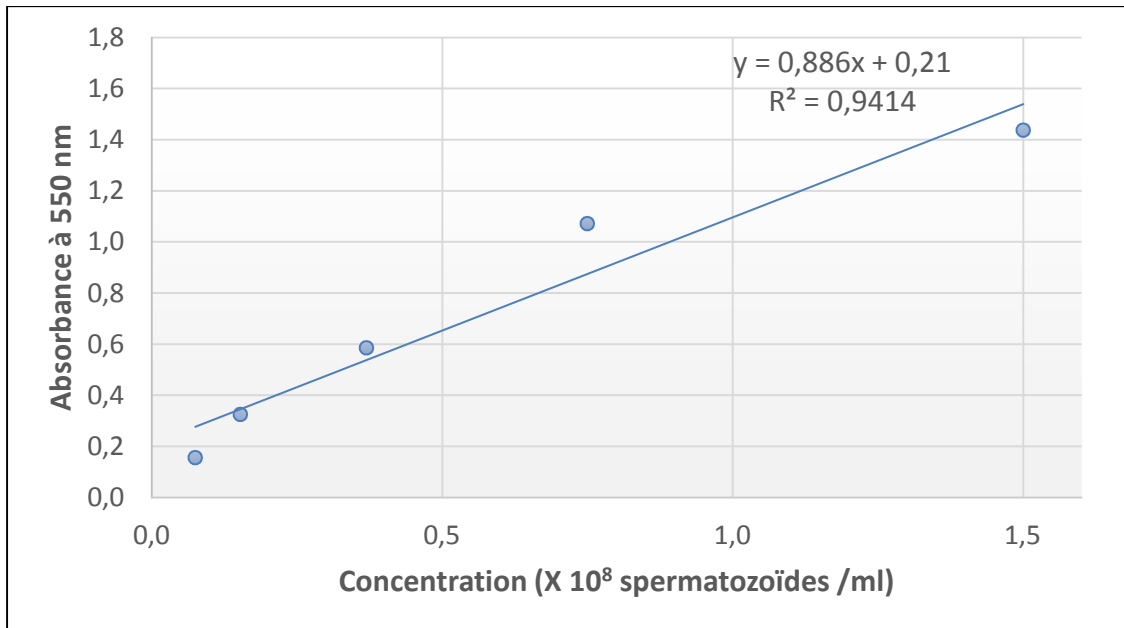
Dans cette partie nous avons exposé l'ensemble des résultats obtenus dans notre travail. Nous commençant d'abord par les résultats relatifs à la comparaison entre les méthodes d'analyse de la concentration des spermatozoïdes dans 12 échantillons du sperme bovin ensuite les méthodes comparatives de la mobilité .

### **II.1. Concentration : comparaison entre la méthode de référence (hématimètre) et la méthode spectrophotométrique**

#### **II.1.1. Description de la courbe d'étalonnage**

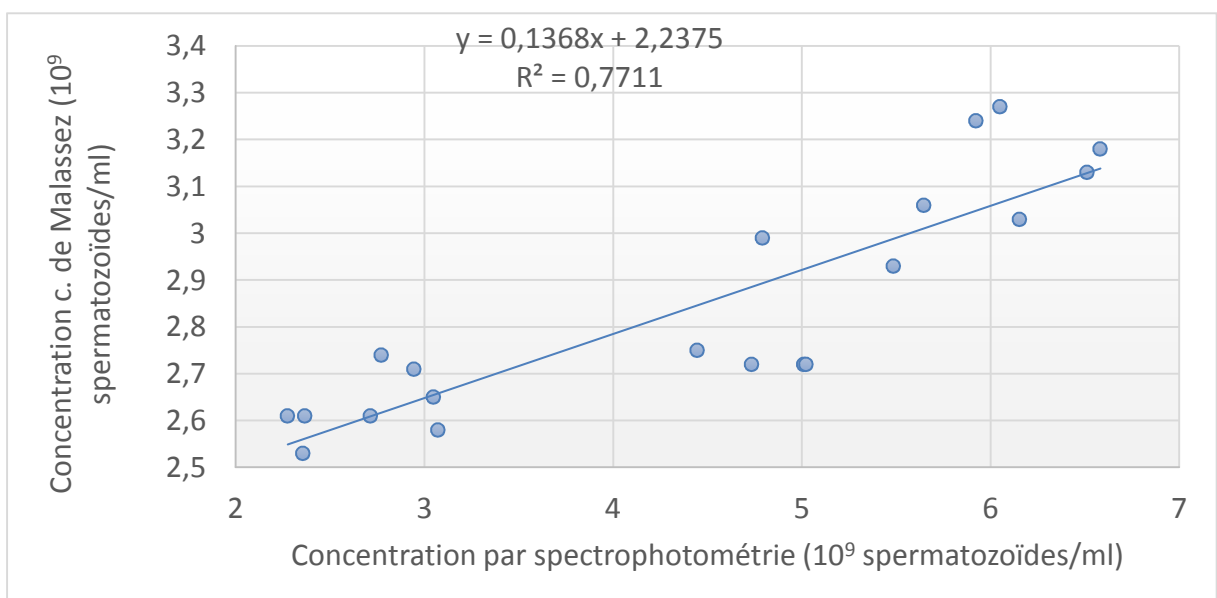
La courbe d'étalonnage obtenue (figure 13) a pour équation :  $y = 0,866x + 0,21$  (x représentant la concentration en  $10^8$  spermatozoïdes / ml et y représentant l'absorbance mesurée par spectrophotométrie). Cette équation a été utilisée pour calculer les concentrations des échantillons à partir de leurs absorbances mesurées par spectrophotométrie en les multipliant par 0.866 et en additionnant au résultat 0.21 et le résultat est exprimé en  $10^8$  spermatozoïdes / ml.

On peut constater d'après la courbe d'étalonnage représentée dans la figure 13, que l'absorbance augmente proportionnellement à l'augmentation de la concentration, et que des variations minimales de concentrations sont détectées par le spectrophotomètre par un changement d'absorbance, ce qui témoigne de la sensibilité de l'appareil à détecter ces variations. En effet, Il apparait, d'après le coefficient de détermination obtenu ( $R^2 = 0,94$ ) et le coefficient de corrélation correspondant ( $r = 0,97$ ) que la courbe d'étalonnage est suffisamment précise pour déterminer les concentrations des échantillons par spectrophotométrie, Ce qui signifie que la méthode spectrophotométrique est suffisamment fiable pour l'estimation de la concentration.



**Figure13** : courbe de point représentant l'évaluation de l'absorbance en fonction de la concentration spermatique.

### II.1.2. Validation du spectrophotomètre pour l'analyse de la concentration spermatique



**Figure 14:** Nuage de points représentant l'évolution de la concentration spermatique mesurée par la cellule de Malassez en fonction de la concentration mesurée par spectrophotométrie.

La courbe d'étalonnage a aidés à effectuer la courbe qui relie la concentration des spermatozoïdes par spectrophotomètre et les concentrations spermatique par la cellule de Malassez.

À partir des points tracés nous avons trouvé une courbe linière dont l'équation  $Y=ax+b$  ( $Y = 0,136x + 2,237$ ) qui permet de prédire les concentrations (x) à partir des absorbances (y) , sachant qu'on a supprimé quelque valeurs extrêmes(certaines répétitions effectuer sur chaque échantillon).

Il apparait, d'après la valeur du coefficient de détermination ( $R^2=0,77$ ) et du coefficient de corrélation correspondant ( $r = 0.87$ ) que les valeurs obtenues par les deux méthodes sont très corrélée entre elles. Des résultats similaires ont été trouvés par de nombreuses études antérieures ayant comparé les deux méthodes chez de nombreuses espèces. A titre d'exemple, chez les abeilles, (Harbo 1975) a signalé une corrélation élevée ( $r=0.995$ ) entre les deux méthodes. Chez le bovin, dans son étude comparative entre plusieurs méthodes d'estimation de la concentration en sperme de 50 éjaculats prélevés de 13 taureaux, (Prathalingam et al. 2006) a signalé un  $r = 0.99$  entre les deux méthodes.

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

### II.1.3. Description du sperme épидидymaire analysé en terme de concentration

**Tableau3 :** Comparaison entre les concentrations moyennes des échantillons et leurs variations obtenues par la méthode de référence et par spectrophotométrie

| échantillon | Hématimétrie |        |      |      | Spectrophotométrie |        |       |       |
|-------------|--------------|--------|------|------|--------------------|--------|-------|-------|
|             | Moy          | E-Type | min  | max  | Moy                | E-Type | min   | max   |
| 1           | 2,61         | 0,00   | 2,61 | 2,61 | 2,45               | 0,23   | 2,27  | 2,71  |
| 2           | 2,72         | 0,00   | 2,72 | 2,72 | 4,92               | 0,16   | 4,73  | 5,02  |
| 3           | 3,13         | 0,47   | 2,75 | 3,65 | 4,60               | 0,18   | 4,45  | 4,79  |
| 4           | 3,06         | 0,36   | 2,78 | 3,47 | 5,58               | 0,10   | 5,48  | 5,68  |
| 5           | 3,22         | 0,16   | 3,06 | 3,37 | 5,80               | 0,14   | 5,65  | 5,92  |
| 6           | 2,74         | 0,22   | 2,53 | 2,96 | 2,64               | 0,25   | 2,36  | 2,79  |
| 7           | 2,65         | 0,07   | 2,58 | 2,71 | 3,02               | 0,07   | 2,94  | 3,07  |
| 8           | 3,27         | 0,20   | 3,13 | 3,49 | 6,53               | 0,05   | 6,49  | 6,58  |
| 9           | 2,88         | 0,12   | 2,74 | 2,98 | 8,78               | 0,37   | 8,44  | 9,17  |
| 10          | 2,89         | 0,07   | 2,81 | 2,94 | 8,74               | 0,13   | 8,61  | 8,87  |
| 11          | 2,77         | 0,01   | 2,76 | 2,78 | 10,89              | 0,03   | 10,87 | 10,92 |
| 12          | 3,26         | 0,22   | 3,03 | 3,47 | 6,15               | 0,10   | 6,05  | 6,26  |
| Total       | 2,84         | 0,24   | 2,53 | 3,27 | 4,39               | 1,54   | 2,27  | 6,58  |

D'une manière générale, à partir des résultats trouvés dans ce tableau, on constate une différence entre la méthode hématimétrique et spectrophotométriques, ceci se traduit par une différence exprimée par leurs moyennes respectives :  $2,84 \pm 0,24$  vs  $4,39 \pm 1,54$ . Les résultats obtenus par la méthode spectrophotométrique ont une plus grande variabilité reflétée par la variance (2,37 vs 0,06) et par les coefficients de variations (CV) (35,08 % vs 8,45 %) plus élevé. Comparé aux résultats d'études antérieures est elle que celle de Harbo (1975), Hansen(2002) et de Prathalingam et al.( 2006), les CV signalés pour la méthode spectrophotométrique ont été moins importants(13,8 %, 4,1 % et 6,3 % respectivement). Cependant Prathalingam et al (2006), ont note un CV (7,8%) pour la méthode hématimétrique à celui qui nous avons trouvé dans la présente étude.

Globalement, d'après ces résultats, on peut constater que la méthode spectrophotométrique surévalue les concentrations par rapport à la méthode de référence. Ces remarques peuvent être appliquées lorsqu'on compare par échantillon et ce pour la plupart des échantillons (10 échantillons /12 soit 83,3 %). Paradoxalement, (Prathalingam et al. 2006) parle de sous-estimation de la concentration par la méthode hématimétrique en raison des CV élevés trouvés pour cette méthode.

En conclusion, la spectrophotométrie a éclairci les concentrations par rapport à la méthode de référence et les résultats sont plus variables, mais cette méthode a l'avantage d'accomplir l'évaluation plus facilement et plus rapidement par rapport à la méthode hématimétrique et comme en témoigne le coefficient de corrélation entre les deux méthodes trouvé dans notre étude ( $r = 0.87$ ) et dans d'autres études similaires, la spectrophotométrie peut constituer une alternative fiable pour l'estimation de la concentration en spermatozoïdes du sperme épидидymaire bovin lorsque le nombre d'échantillon est élevé.

## II.2. mobilité : comparaison entre la méthode de référence (CASA) et la méthode spectrophotométriques :

La mobilité des échantillons de sperme dilués et coincubés avec le plasma ayant une concentration d'environ  $50 \times 10^6$  spermatozoïdes /ml a été mesurée, à la fois, avec l'analyseur informatique (CASA) qui a mesuré les différents paramètres pour chaque spermatozoïde et qui les a répartis en plusieurs catégories, et avec la méthode spectrophotométrique à la longueur d'onde  $\lambda = 550$  nm.

Les corrélations entre ses différents paramètres et ses différentes catégories de spermatozoïdes mesurés par le CASA et les absorbances mesurées par spectrophotométrie sont résumées dans les tableaux 4 et 5. Les figures 15 et 16, d'un côté, et les figures 17 et 18, d'un autre, représentent, respectivement, les deux catégories (% totaux de spermatozoïdes mobiles et % de spermatozoïdes rapides) et les deux paramètres (VCL et ALH) qui sont les plus corrélés avec les absorbances à  $\lambda = 550$  nm avec des coefficients de corrélations (r) de 0,84, 0,75 et 0,82 et 0,87 respectivement.

**Tableau4** : corrélations (r) entre les absorbances obtenues par spectrophotométrie et les pourcentages des différentes catégories de spermatozoïdes mesurés par le CASA et la qualité de la régression linéaire ( $R^2$ ) obtenues pour chaque catégorie.

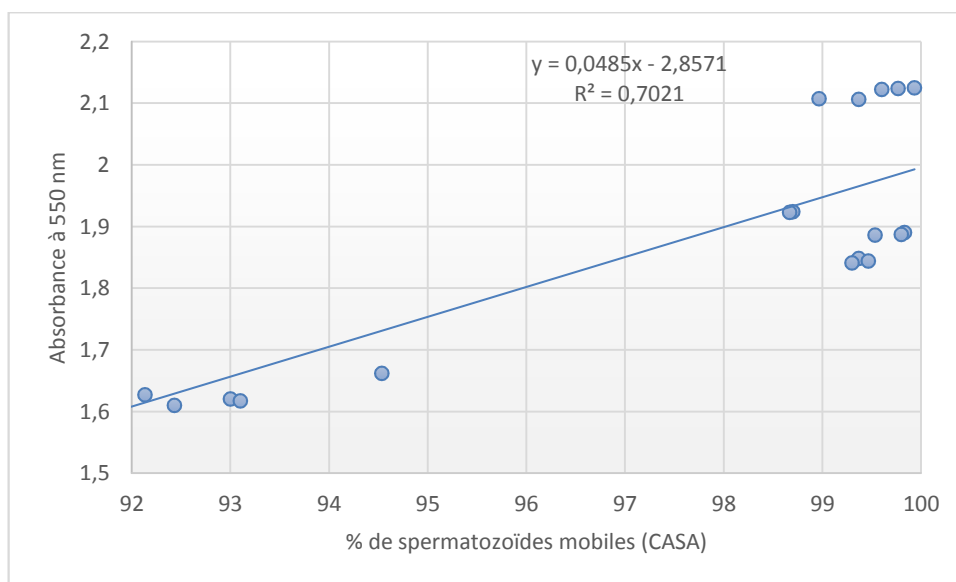
| Catégories          | r      | $R^2$ |
|---------------------|--------|-------|
| Statiques           | 0,84   | 0,70  |
| Lents               | - 0,20 | 0,04  |
| Moyens              | - 0,58 | 0,34  |
| Rapides             | 0,75   | 0,56  |
| Progressifs Moyens  | - 0,05 | 0,00  |
| Progressifs Rapides | - 0,62 | 0,39  |
| Progressifs total   | - 0,45 | 0,20  |
| Mobiles total       | 0,84   | 0,70  |

**Tableau5** : corrélations (r) entre les absorbances obtenues par spectrophotométrie et les différents paramètres de la mobilité spermatique mesurés par le CASA et les qualités de la régression linéaire (R<sup>2</sup>) obtenues pour chaque paramètre.

| Paramètre | r     | R <sup>2</sup> |
|-----------|-------|----------------|
| VCL       | 0,82  | 0,68           |
| VSL       | 0,73  | 0,54           |
| VAP       | 0,77  | 0,60           |
| ALH       | 0,87  | 0,76           |
| BCF       | 0,44  | 0,19           |
| LIN       | -0,45 | 0,21           |
| STR       | -0,55 | 0,30           |
| WOB       | 0,51  | 0,26           |

### II.2.1 Le pourcentage des spermatozoïdes mobiles

La figure 15 représentant la corrélation entre la catégorie des spermatozoïdes mobiles et les absorbances mesurées par spectrophotométrie montre que ces deux paramètres sont reliés par l'équation de régression suivante :  $y = 0,048x - 2,857$

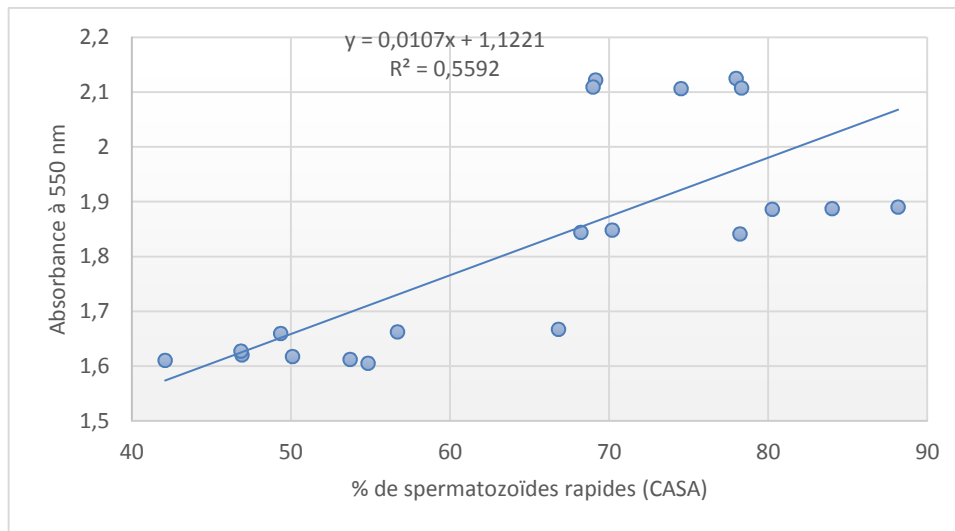


**Figure15** : Corrélation entre le pourcentage des spermatozoïdes mobiles mesuré par le CASA et l'absorbance à  $\lambda = 550$  nm mesurée par spectrophotométrie.

Il apparaît que les absorbances sont très corrélées positivement avec le pourcentage de mobilité comme l'illustre le coefficient de corrélation ( $r = 0,84$ ).

### II.2.2. Pourcentage de spermatozoïdes rapides

La figure 16, quant à elle, représente la corrélation entre la catégorie des spermatozoïdes rapides et les absorbances mesurées par spectrophotométrie et montre que ces deux paramètres sont reliés par l'équation de régression suivante :  $y = 0,0107x + 1,1221$ .



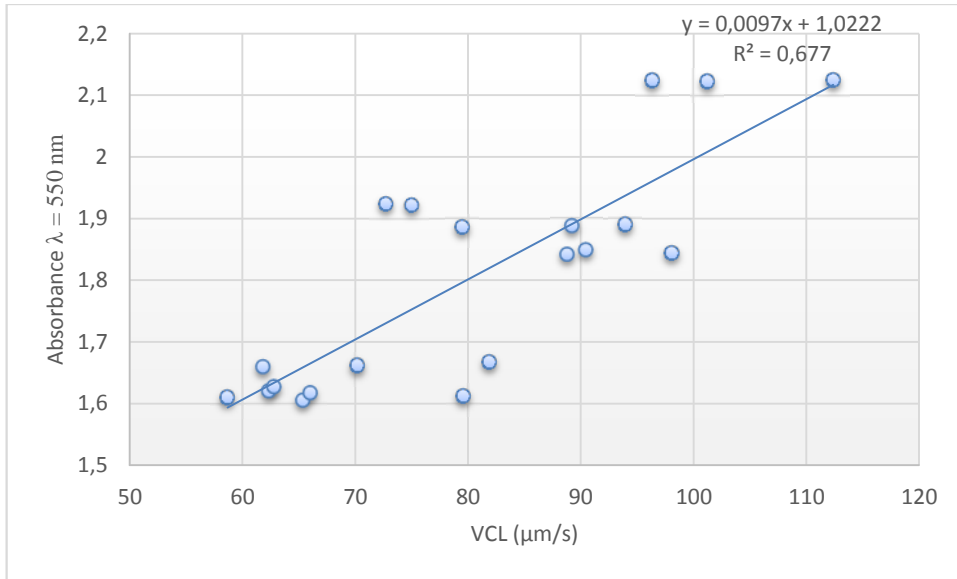
**Figure16 :** Corrélation entre le pourcentage des spermatozoïdes rapides mesuré par le CASA et l'absorbance à  $\lambda = 550$  nm mesurée par spectrophotométrie.

Là également, il apparaît que les absorbances sont corrélées positivement avec le pourcentage de spermatozoïdes rapides ( $r = 0,75$ ) qui représente la sous-catégorie de spermatozoïdes mobiles la plus corrélée avec les absorbances (voir tableau 4).

### II.2.3. VCL (Vitesse curvilinéaire)

La figure 17 illustre la liaison entre la VCL mesurée par CASA et les absorbances dont l'équation de la courbe de régression est la suivante :  $y = 0,0097x + 1,0222$



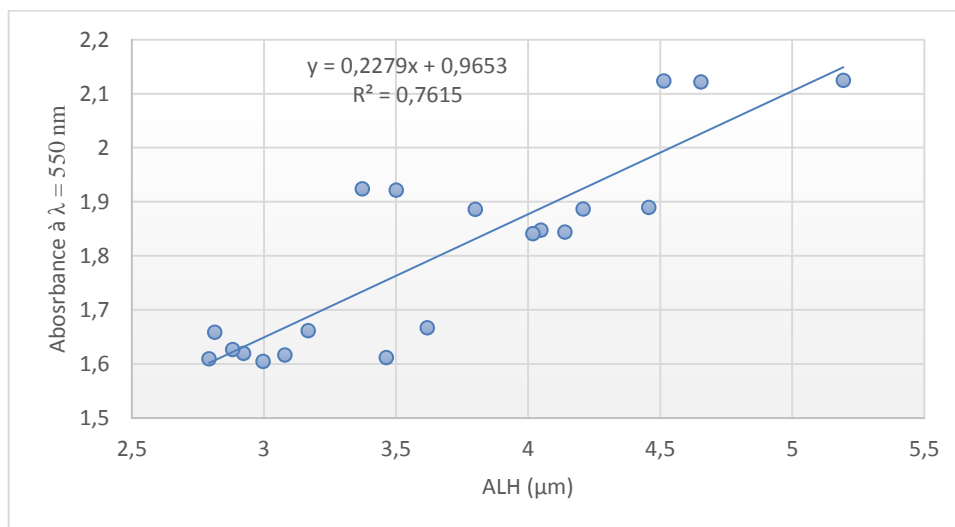


**Figure17** : Corrélation entre la VCL mesurée par le CASA et l'absorbance à  $\lambda = 550$  nm mesurée par spectrophotométrie.

Le coefficient de corrélation de  $r = 0,82$  indique une corrélation élevée entre la VCL et les absorbances mesurées par spectrophotométrie ceci signifie que la spectrophotométrie détecte la VCL plus que les autres paramètres (excepté l'ALH : voir ci-dessous).

#### II.2.4. ALH (amplitude de déplacement latéral de la tête)

La figure 18 montre la liaison entre les amplitudes moyennes du déplacement latéral de la tête mesurée par CASA et les absorbances dont l'équation de la courbe de régression est la suivante :  $y = 0,227x + 0,965$ .



**Figure 18** : Corrélation entre la (ALH) mesurée par le CASA et l'absorbance à  $\lambda = 550$  nm mesurée par spectrophotométrie.

Le coefficient de corrélation de  $r = 0.87$  reflète la corrélation élevée entre l'ALH et les absorbances mesurées par spectrophotométrie ceci pourrait signifier que la spectrophotométrie détecte plus l'ALH que les autres paramètres.

Il est connu depuis longtemps que les propriétés (rhéotatiques et optiques anisotropiques) du sperme peuvent être exploitées pour estimer la mobilité spermatique (Wishart & Ross 1985). Evaluer la mobilité par spectrophotométrie a été testé chez de nombreuses espèces notamment chez les volailles (Wishart & Ross 1985) et chez l'homme (Atherton et al. 1978) et elle a été comparée à la méthode subjective de la mesure de la mobilité.

Dans notre présent travail, on a comparé la méthode spectrophotométrique avec la méthode objective de la mobilité spermatique sur le sperme épидидymaire bovin.

On a constaté que le % de spermatozoïdes mobiles mesurée par CASA et assez corrélé ( $r = 0.84$ ) à l'absorbance mesurée par spectrophotométrie et que parmi toutes les catégories de spermatozoïdes mobiles, c'est le % des spermatozoïdes rapides qui est le plus corrélé à l'absorbance. La comparaison entre la méthode spectrophotométrique et la méthode subjective de l'évaluation de mobilité a révélé que c'est le % de spermatozoïdes progressifs qui est le plus corrélé ( $r = 0.92$ ) à l'absorbance Atherton et al. (1978). Ceci contraste avec les résultats de cette présente étude dans laquelle on a constaté une corrélation négative modérée avec le % de spermatozoïdes progressifs en général ( $r = -0.45$ ) et une corrélation un peu plus élevée mais toujours négative avec le % de spermatozoïdes progressifs rapides ( $r = -0.62$ ).

Par ailleurs, parmi tous les paramètres mesurés par le CASA, c'est l'ALH et la VCL qui sont les plus corrélés à l'absorbance ( $r$  respectifs de 0.87 et 0.82), ce qui explique que la spectrophotométrie détecte plus les spermatozoïdes rapides, qui ne progressent pas beaucoup et ceci devient évident lorsqu'on tient en compte de la relation relativement faible et négative de l'absorbance avec le pourcentage de linéarité ( $r = -0.45$ ) et aussi avec le % de spermatozoïdes progressifs ( $r = -0.45$ ) abordée précédemment.

## Conclusion

Cette présente étude a eu pour objectif de comparer des méthodes d'analyse de la concentration et de la mobilité de sperme épидидymaire bovin et d'optimiser les protocoles pour leur réalisation pratique localement.

Pour la concentration spermatique, on a comparé la méthode hématimétrique qui reste la méthode de référence la plus courante et la plus commune, en utilisant l'hématimètre de Malassez, et la méthode spectrophotométrique qui représente une alternative plus rapide et plus sensible puisqu'elle est capable de détecter des variations minimales de concentration, en utilisant une courbe d'étalonnage pour l'estimation des concentrations. Les deux méthodes ont donné des valeurs très positivement corrélées ( $r = 0.87$ ). Cependant, on a constaté que les valeurs obtenues par la méthode spectrophotométrique ont une plus grande variabilité (CV = 35% vs 8.45 % pour la méthode hématimétrique) et que cette méthode a, quasi systématiquement (dans 83% des cas), surévalué les concentrations des échantillons. Ceci pourrait s'expliquer notamment par le nombre réduit d'échantillons analysés dans la présente étude.

Pour la mobilité spermatique, la méthode objective par CASA d'évaluation qui constitue la méthode de référence dans le cas de cette étude a été confrontée à la méthode spectrophotométrique. On a notamment remarqué une corrélation positive et assez importante ( $r = 0.84$ ) entre le pourcentage des spermatozoïdes mobiles et l'absorbance à  $\lambda = 550$  nm. On a également constaté que la sous-population des spermatozoïdes mobiles rapide la plus corrélée à l'absorbance. Par ailleurs, la comparaison entre les paramètres mesurés par CASA et l'absorbance mesurée par spectrophotométrie a révélé que c'est l'amplitude de déplacement latéral de la tête (ALH) et la vitesse curvilinéaire (VCL) qui sont les paramètres les plus détectés par la spectrophotométrie.

Par conséquent, la spectrophotométrie peut constituer une méthode alternative assez fiable pour mesurer la concentration des spermatozoïdes notamment lorsque le nombre d'échantillons est élevé. Par contre, pour la mobilité, la spectrophotométrie ne fournit qu'un aperçu sur la mobilité globale et sur le pourcentage des spermatozoïdes rapides notamment les non progressifs.

## Références bibliographiques

- Anzar M, Kroetsch T, Buhr MM. 2009. Comparison of Different Methods for Assessment of Sperm Concentration and Membrane Integrity With Bull Semen. *J Androl* [Internet]. 30:661–668. Available from: <http://doi.wiley.com/10.2164/jandrol.108.007500>
- Atherton RW, Radany EW, Polakoski KL. 1978. Spectrophotometric Spermatozoon Quantitation Motility of Mammalian in determining. :624–628.
- Belkadi S, Alloui N, Belkacem L, Aissi A, Safsaf B, Djaaba M, Idir K. 2013. Etude de la vitalité et de la mobilité des spermatozoïdes épидидymaires conservés à 4°C chez la race Ouled Djellel. *Renc Rech Ruminants*. 20:2013.
- Cabannes C. 2008. Comparaison Des Methodes D ' Evaluation De La Qualite De La Semence Dans Les Especies Bovine , Canine Et Humaine. [place unknown]: l'Université Paul-Sabatier de Toulouse.
- Dayon A. 2008. Role de la sphingosine kinas-1 dans la survie et la progresion des cellule tumorales prostatiques LNCaP vers l'androgén-indépendance. [place unknown]: l'université de toulouse.
- Forges T, Foliguet B. 2001. La vitalit des spermatozoides. Centre d'Assistance Mddicale h la Procrdation, Maternitd R@ionale, NANCY R]~SUME :45–55.
- Gbangboche AB, Alkoiret TI, Chrysostome C, Dossou-Bodjrenou J, Aissi E, Adjovi A, Adamou-N'diaye MS, Bister JL. 2012. Effet de la fréquence de récolte et des milieux de dilution sur la qualité du sperme de taureau de race Borgou. *Int J Biol Chem Sci* [Internet]. 5:1871–1882. Available from: <http://www.ajol.info/index.php/ijbcs/article/view/77121>
- Hanzen. 2010. Rappels anatomophysiologicals relatifs à la reproduction du taureau. :1–10.
- Hanzen PC. 2009. Propédeutique de l ' appareil génital mâle des ruminants. 1-21
- Harbo JR. 1975. Measuring the Concentration of spermatozoa from Honey bees with spectrophotometry. *Ann Entomol Soc Am*. 68:1050–1052.
- Hebert A, Bovins LESS. 2011. Caractérisation de l'activité phosphodiesterase chez les spermatozoïdes bovins. Département des Sciences Animales ,faculté des sciences de l'agriculture et de l'alimentation université laval québec :162

- Kabera F. 2008. Appréciation de la qualité de la semence bovine produite au centre national d'amélioration génétique (CNAG) de Dahra au Sénégal. [place unknown]: universite cheikh anta diop de dakar:26
- Kohler C. 2011. L ' appareil génital masculin. Support Cours (Version PDF) -Université Médicale Virtuelle Francoph:15
- Konfe H. 2014. Etude spermiologique des bovins de races locales de l'Afrique de l'Ouest : cas du Borgou , du taurin Lagunaire , du taurin N'Dama et du Zébu Peulh.,Université polytechnique de Bobo-Dioulasso:87
- Marc S. 2015. Actualités en cryoconservation des semences des principales espèces d'intérêt vétérinaire. [place unknown]: Lyon:163
- OPTMQ. 2016. Guide sur l'examen et la préparation de sperme. [place unknown].
- Ponthier J. 2012. Pathologie de la Reproduction des Animaux de Compagnie et Equidés, Clinique des Animaux de Compagnie et des Equidés:9
- Prathalingam NS, Holt WW, Revell SG, Jones S, Watson PF. 2006. The Precision and Accuracy of Six Different Methods to Determine Sperm Concentration. J Androl [Internet]. 27:257–262. Available from: <http://doi.wiley.com/10.2164/jandrol.05112>
- Rigal FBG. 2008. Semence de taureaux collectée à l'électro-éjaculateur ou au vagin artificiel. [place unknown]: Toulouse:99
- Salson OG. 2008. Récolte et conservation du sperme chez les félins : étude bibliographique. [place unknown]: Lyon:201
- Wishart GJ, Ross FH. 1985. Characterization of a Spectrophotometric Technique for the Estimation of Fowl and Turkey Sperm Motility. 178:169–178.

## Sommaire

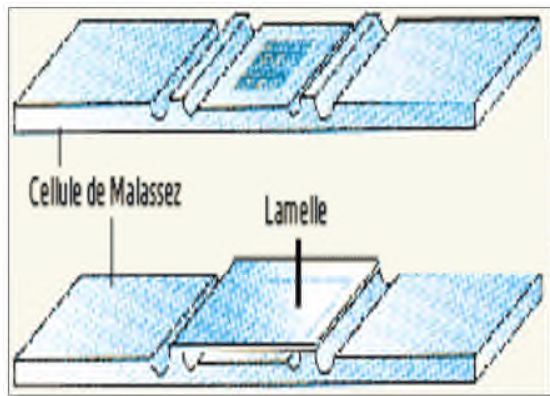
|  |    |
|--|----|
| Introduction .....   | 1  |
| Chapitre 1 : La reproduction chez les bovins.....  | 3  |
| I. Rappels anatomiques sur l'appareil génital du taureau .....   | 3  |
| I.1. Partie glandulaire .....  | 3  |
| I.2. Partie excrétrice .....   | 4  |
| II. Physiologie de l'appareil reproducteur de taureau .....  | 6  |
| II.1. Puberté.....   | 6  |
| II.2. La production du sperme .....  | 7  |
| II.3. Plasma séminal .....   | 9  |
| Chapitre 2 : Technologie de la semence bovine.....   | 10 |
| 1. Collecte du sperme.....   | 10 |
| 1.1. Collecte du sperme à l'aide du vagin artificiel.....  | 10 |
| 1.2 Electroéjaculation.....  | 10 |
| 1.3. La collecte du sperme épидидymaire .....  | 11 |
| 2. Analyse de la qualité du sperme récolté.....  | 11 |
| 2.1. Examens macroscopique.....  | 11 |
| 2.2. Examen microscopique .....  | 12 |
| I. Matériel et méthodes.....   | 18 |
| I.1. La collecte du sperme épидидymaire .....  | 18 |
| I. 1.1. Matériel .....   | 18 |
| I. 1.2. Méthode de collecte .....  | 18 |
| I.2. L'analyse du sperme collecté.....   | 20 |
| I.2.1. Analyse de la concentration .....   | 20 |
| I.2.2. Analyse de la mobilité .....  | 22 |
| II. Résultats et discussion.....   | 25 |
| II.1. Concentration : comparaison entre la méthode de référence (hématimètre)et la méthode spectrophotométrique..... | 25 |

|  |           |
|--|-----------|
| II.1.1. Description de la courbe d'étalonnage .....  | 25        |
| II.1.2. Validation du spectrophotomètre pour l'analyse de la concentration spermatique.....                  | 26        |
| II.1.3. Description du sperme épидидymaire analysé en terme de concentration .....                           | 27        |
| II.2. mobilité : comparaison entre la méthode de référence (CASA) et la méthode spectrophotométriques :..... | 30        |
| II.2.1 Le pourcentage des spermatozoïdes mobiles .....   | 31        |
| II.2.2. Pourcentage de spermatozoïdes rapides .....  | 32        |
| II.2.3. Vitesse curvilinéaire(VCL) .....   | 32        |
| II.2.4. amplitude de déplacement latéral de la tête(ALH).....  | 33        |
| <b>Conclusion</b> .....  | <b>35</b> |

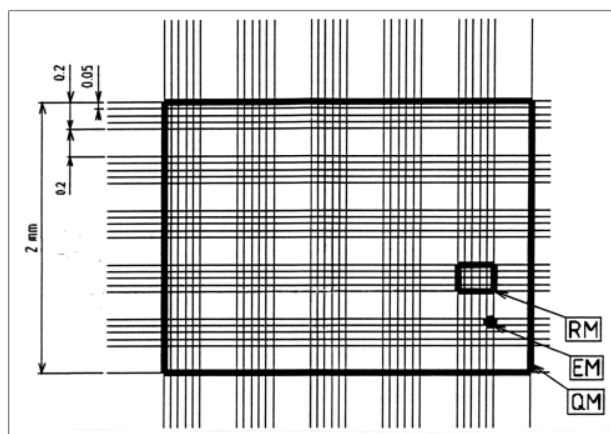
## Annexe

### Description de l'hématimètre de Malassez

L'hématimètre ou cellule de Malassez, est une lame de verre spéciale comportant 2 rigoles qui délimitent une surface plane. Lorsqu'on place la lamelle, celle-ci est maintenue à une certaine distance de la lame, ce qui permet de définir un volume calibré entre lame et lamelle : Un quadrillage (ou deux) est tracé au centre de la lame : il délimite 100 « rectangle », un quart de ces rectangles sont eux-mêmes subdivisés en 20 carrés pour former des « périmètres de comptage » .(“Numération de cellules à l' aide d' une lame de comptage,” n.d.).



### Forme général de l'hématimètre de Malassez.



**Quadrillage de la cellule de Malassez. Il a une forme rectangulaire (QM). Il est composé de 100 rectangles dont 25, appelés périmètres de comptage (RM) sont subdivisés en 20 petits carrés (EM).**



### Description de la cellule de Makler

La cellule de Makler est une cellule de comptage à profondeur contrôlée pour l'obtention d'une monocouche de spermatozoïdes. Elle est équipée d'une lamelle quadrillée en 100 carrés de 0,1 mm de côté. La profondeur de la cellule est de 10  $\mu\text{m}$

- Le comptage des spermatozoïdes se fait, dans la majorité des cas, sans dilution.
- Le nombre de spermatozoïdes comptés dans 10 carrés donne la concentration directe en millions par ml.



La cellule de comptage makler (source :

<http://www.microopticsl.com/fr/produits/consommables/mobilite-et-concentration/makler/> ;

consultée le 26/05/2017

### Description de l'hématimètre de Thoma

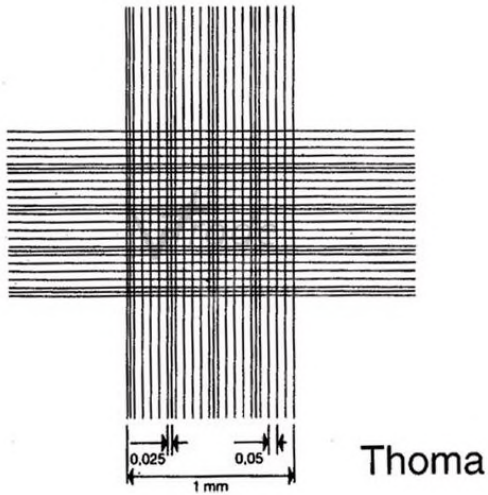
Nous appellerons « zone de comptage » ou « quadrillage total » la zone constituée par l'entrecroisement des lignes horizontales et des lignes verticales :

- 16 grands carrés contenant chacun 16 petits carrés
- + 4 groupes de 3 lignes horizontales + 4 groupes de 3 lignes verticales

### Le quadrillage total

- Volume : 0,1  $\mu\text{l}$
- Côté : 1 mm
- Hauteur : 0,1 mm

- Côté de chaque petit carré : 0,05 mm
- Volume délimité par 1 petit carré : 0,00025  $\mu\text{l}$
- Volume délimité par 16 petits carrés : 0,004  $\mu\text{l}$



**Quadrillage de la cellule de Thoma (Source :**

[www.bioltrop.fr/IMG/doc/Thoma\\_hematimetre.doc](http://www.bioltrop.fr/IMG/doc/Thoma_hematimetre.doc) ; consultée le 26/05/2017)

## **Résumé :**

L'objectif du présent travail a été de comparer des méthodes d'analyse de la concentration et la mobilité de sperme épидидymaire bovin et d'optimiser les protocoles pour leur utilisation au niveau local. Pour cela 12 testicules de taureaux ont été récupérés de l'abattoir et le sperme a été collecté par la méthode rétrograde-flushing. Le sperme collecté a été dilué 1:200 (v/v) avec l'eau distillée pour la mesure de la concentration à l'aide de l'hématimètre de Malassez et par spectrophotométrie (à  $\lambda = 550$  nm). Pour l'analyse de la mobilité, le sperme frais a été pré-dilué 1:20 avec de la solution saline puis co-incubé (1 :1,35 v/v) avec du plasma prélevé de vache préalablement dilué 1 :10 (v/v) pour stimuler la mobilité. Cette dernière a été évaluée par spectrophotométrie et par analyseur informatique (CASA). Pour l'analyse de la concentration, la comparaison entre la méthode hématimétrique qui représente la méthode de référence par excellence et la méthode spectrophotométrique a révélé que cette dernière représente une alternative (puisque les résultats des 2 méthodes sont très corrélés avec  $r = 0.87$ ) plus rapide et plus sensible grâce à sa capacité à détecter des variations minimales de concentration. Cependant, les valeurs obtenues par cette méthode ont une plus grande variabilité (CV = 35% vs 8.45 %) et cette méthode a, quasi systématiquement surévalué les concentrations des échantillons. Pour la mobilité, on a notamment remarqué une corrélation positive et assez importante ( $r = 0.84$ ) entre le % de spermatozoïdes mobiles et l'absorbance à  $\lambda = 550$  nm. On a également constaté que la sous-population de spermatozoïdes mobiles la plus corrélée à l'absorbance a été les spermatozoïdes rapides. et on a révélé que c'est l'amplitude de déplacement latéral de la tête (ALH) et la vitesse curvilinéaire (VCL) qui sont les paramètres les plus détectés par la spectrophotométrie. La spectrophotométrie peut constituer une méthode alternative assez fiable pour mesurer la concentration des spermatozoïdes notamment lorsque le nombre d'échantillons est élevé mais, pour la mobilité, elle ne fournit qu'un aperçu sur la mobilité globale et sur le % de spermatozoïdes rapides notamment les non progressifs.

**Mot clés :** sperme épидидymaire bovin, analyse comparative, mobilité, concentration

The objective of this work was to compare methods of analysis of the concentration and mobility of bovine epididymal sperm and to optimize the protocols for their use at the local level. For this, 12 bull testicles were recovered from the slaughterhouse and the sperm was collected by retrograde-flushing method. The collected sperm was diluted 1: 200 (v/v) with distilled water to measure the concentration using the Malassez hemocytometer and spectrophotometrically (at  $\lambda = 550$  nm). For the mobility analysis, the fresh semen was pre-diluted 1:20 with saline and then co-incubated (1: 1.35 v/v) with previously diluted cow plasma (1:10 v/v) to stimulate mobility. This latter was evaluated by spectrophotometry and by computer analyzer (CASA). For the analysis of the concentration, the comparison between the hemocytometric method which represents the reference method and the spectrophotometric method revealed that this latter represents a fast and more sensitive alternative (since the results of the two methods are very correlated with  $r = 0.87$ ) because to its ability to detect small variations in concentration. However, the values obtained by this method have a greater variability (CV = 35% vs 8.45%) and this method has almost systematically overestimated the concentrations of the samples. For mobility, a positive and fairly significant correlation ( $r = 0.84$ ) between the % of mobile spermatozoa and the absorbance at  $\lambda = 550$  nm was observed. It was also found that the mobile sperm sub-population most correlated with the absorbance was the % of fast spermatozoa and it was found that it is the head's lateral displacement amplitude (ALH) and the curvilinear velocity (VCL) which are the most detected parameters by spectrophotometry. Spectrophotometry can be a relatively reliable alternative method for measuring the concentration of spermatozoa, especially when the number of samples is high, but for mobility it provides only an overview of the overall mobility and the percentage of fast spermatozoa specially the no progressive ones.

**Key words:** Bovine epididymal sperm, comparative analysis, mobility, concentration