



Open Archive TOULOUSE Archive Ouverte (OATAO)

OATAO is an open access repository that collects the work of Toulouse researchers and makes it freely available over the web where possible.

This is an author-deposited version published in : <http://oatao.univ-toulouse.fr/Eprints> ID : 14682

To cite this version :

Dessay, Sabine. *Étude de l'effet du colorant et du dilueur sur la viabilité et le pourcentage d'anomalies morphologiques de spermatozoïdes frais de taureaux*. Thèse d'exercice, Médecine vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse - ENVT, 2015, 52 p.

Any correspondance concerning this service should be sent to the repository administrator: staff-oatao@inp-toulouse.fr.

ETUDE DE L'EFFET DU COLORANT ET DU DILUEUR SUR LA VIABILITE ET LE POURCENTAGE D'ANOMALIES MORPHOLOGIQUES DE SPERMATOZOÏDES FRAIS DE TAUREAU

THESE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR VETERINAIRE

DIPLOME D'ETAT

*présentée et soutenue publiquement
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

par

DESSAY Sabine

Née, le 23 avril 1989 à Montpellier (34)

Directeur de thèse : M. Xavier BERTHELOT

JURY

PRESIDENT :

M. Louis BUJAN

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEURS :

M. Xavier BERTHELOT

Mme Nicole HAGEN

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

MEMBRES INVITES :

M. Dr Brahim KHIREDDINE

Mme Dr Patricia RONSIN

Vétérinaire praticien à Midatest

Ingénieur d'étude à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

**Ministère de l'Agriculture de l'Agroalimentaire et de la Forêt
ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE**

Directrice : **Madame Isabelle CHMITELIN**

PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE

- M. **AUTEFAGE André**, *Pathologie chirurgicale*
- Mme **CLAUW Martine**, *Pharmacie-Toxicologie*
- M. **CONCORDET Didier**, *Mathématiques, Statistiques, Modélisation*
- M. **DELVERDIER Maxence**, *Anatomie Pathologique*
- M. **ENJALBERT Francis**, *Alimentation*
- M. **FRANC Michel**, *Parasitologie et Maladies parasitaires*
- M. **MARTINEAU Guy**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*
- M. **PETIT Claude**, *Pharmacie et Toxicologie*
- M. **REGNIER Alain**, *Physiopathologie oculaire*
- M. **SHELCHER François**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*

PROFESSEURS 1° CLASSE

- M. **BERTAGNOLI Stéphane**, *Pathologie infectieuse*
- M. **BERTHELOT Xavier**, *Pathologie de la Reproduction*
- M. **BOUSQUET-MELOU Alain**, *Physiologie et Thérapeutique*
- M. **DUCOS Alain**, *Zootecnie*
- M. **FOUCRAS Gilles**, *Pathologie des ruminants*
- Mme **GAYRARD-TROY Véronique**, *Physiologie de la Reproduction, Endocrinologie*
- Mme **HAGEN-PICARD, Nicole**, *Pathologie de la reproduction*
- M. **LEFEBVRE Hervé**, *Physiologie et Thérapeutique*
- M. **MEYER Gilles**, *Pathologie des ruminants*
- M. **SANS Pierre**, *Productions animales*
- Mme **TRUMEL Catherine**, *Biologie Médicale Animale et Comparée*

PROFESSEURS 2° CLASSE

- M. **BAILLY Jean-Denis**, *Hygiène et Industrie des aliments*
- Mme **BENARD Geneviève**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
- Mme **BOURGES-ABELLA Nathalie**, *Histologie, Anatomie pathologique*
- M. **BRUGERE Hubert**, *Hygiène et Industrie des aliments d'Origine animale*
- Mme **CHASTANT-MAILLARD Sylvie**, *Pathologie de la Reproduction*
- M. **GUERRE Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
- M. **GUERIN Jean-Luc**, *Aviculture et pathologie aviaire*
- M. **JACQUIET Philippe**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
- M. **LIGNEREUX Yves**, *Anatomie*
- M. **PICAVET Dominique**, *Pathologie infectieuse*

PROFESSEURS CERTIFIES DE L'ENSEIGNEMENT AGRICOLE

- Mme **MICHAUD Françoise**, *Professeur d'Anglais*
- M. **SEVERAC Benoît**, *Professeur d'Anglais*

MAITRES DE CONFERENCES HORS CLASSE

- M. **BERGONIER Dominique**, *Pathologie de la Reproduction*
- Mme **BOUCLAINVILLE-CAMUS Christelle**, *Biologie cellulaire et moléculaire*
- Mlle **BOULLIER Séverine**, *Immunologie générale et médicale*
- Mlle **DIQUELOU Armelle**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
- M. **DOSSIN Olivier**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
- M. **JOUGLAR Jean-Yves**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*
- Mme **LETRON-RAYMOND Isabelle**, *Anatomie pathologique*
- M. **LYAZRHI Faouzi**, *Statistiques biologiques et Mathématiques*
- M. **MATHON Didier**, *Pathologie chirurgicale*
- Mme **PRIYMENKO Nathalie**, *Alimentation*

MAITRES DE CONFERENCES (classe normale)

- M. **ASIMUS Erik**, *Pathologie chirurgicale*
- Mme **BENNIS-BRET Lydie**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*
- Mlle **BIBBAL Delphine**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
- Mme **BOUHSIRA Emilie**, *Parasitologie, maladies parasitaires*
- Mlle **CADIERGUES Marie-Christine**, *Dermatologie*
- M. **CONCHOU Fabrice**, *Imagerie médicale*
- M. **CORBIERE Fabien**, *Pathologie des ruminants*
- M. **CUEVAS RAMOS Gabriel**, *Chirurgie Equine*
- Mme **DANIELS Hélène**, *Microbiologie-Pathologie infectieuse*
- Mlle **DEVIERS Alexandra**, *Anatomie-Imagerie*
- M. **DOUET Jean-Yves**, *Ophthalmologie vétérinaire et comparée*
- Mlle **FERRAN Aude**, *Physiologie*
- M. **GUERIN Jean-Luc**, *Elevage et Santé avicoles et cunicoles*
- M. **JAEG Jean-Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
- Mlle **LACROUX Caroline**, *Anatomie Pathologique des animaux de rente*
- Mlle **LAVOUE Rachel**, *Médecine Interne*
- M. **LIENARD Emmanuel**, *Parasitologie et maladies parasitaires*
- M. **MAILLARD Renaud**, *Pathologie des Ruminants*
- Mme **MEYNADIER Annabelle**, *Alimentation*
- Mme **MEYNAUD-COLLARD Patricia**, *Pathologie Chirurgicale*
- M. **MOGICATO Giovanni**, *Anatomie, Imagerie médicale*
- M. **NOUVEL Laurent**, *Pathologie de la reproduction (en disponibilité)*
- Mlle **PALIERNE Sophie**, *Chirurgie des animaux de compagnie*
- Mlle **PAUL Mathilde**, *Epidémiologie, gestion de la santé des élevages avicoles et porcins*
- Mme **PRADIER Sophie**, *Médecine interne des équidés*
- M. **RABOISSON Didier**, *Productions animales (ruminants)*
- M. **VOLMER Romain**, *Microbiologie et Infectiologie*
- M. **VERWAERDE Patrick**, *Anesthésie, Réanimation*
- Mme **WARET-SZKUTA Agnès**, *Production et pathologie porcine*

MAITRES DE CONFERENCES et AGENTS CONTRACTUELS

- M. **DAHAN Julien**, *Médecine Interne*

ASSISTANTS D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE CONTRACTUELS

- Mme **COSTES Laura**, *Hygiène et industrie des aliments*
- Mme **LALLEMAND Elodie**, *Chirurgie des Equidés*
- M. **TANIS Jean-Benoît**, *Anatomie – Imagerie Médicale*

Remerciements

Monsieur le Professeur Louis BUJAN,

Professeur à l'Université Paul Sabatier de Toulouse,
Praticien hospitalier au CHU de Toulouse,
Andrologie et biologie de la reproduction

Qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de ce jury de thèse.
Hommage respectueux.

Monsieur le Professeur Xavier BERTHELOT,

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse,
Pathologie de la reproduction

Qui nous a fait l'honneur de diriger cette thèse. Pour la liberté et la confiance accordées dans ce travail.

Madame le Professeur Nicole HAGEN-PICARD,

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse,
Pathologie de la reproduction

Qui a très aimablement accepté de faire partie de ce jury de thèse.
Sincères remerciements.

Madame le Docteur Patricia RONSIN,

Ingénieur d'étude à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse,
Pathologie de la reproduction

Pour votre disponibilité et votre aide précieuse lors des manipulations et pour la lecture des lames.
Sincères remerciements.

Monsieur le Docteur Brahim KHIREDDINE,

Docteur vétérinaire de MIDATEST à Soual,

Qui a très aimablement accepté de faire partie de ce jury de thèse. Pour votre disponibilité et votre accueil. Sincères remerciements.

Monsieur Faouzi LYAZRHI,

Maître de conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse,
Statistiques biologiques et Mathématiques

Pour votre disponibilité, votre patience et votre gentillesse.
Sincères remerciements.

Madame Aline BOUSSARIE,

Technicienne de laboratoire de MIDATEST à Soual,

Pour votre aide précieuse, votre disponibilité, et votre gentillesse.
Sincères remerciements.

Table des matières

REMERCIEMENTS.....	5
TABLE DES MATIERES	6
TABLE DES FIGURES.....	8
TABLE DES TABLEAUX	9
LISTE DES ABREVIATIONS	11
1. Introduction	12
2. Matériels et méthodes	14
2.1.Taureaux.....	14
2.2.Récolte.....	14
2.3.Examen de la semence	14
2.3.1. Volume	14
2.3.2. Motilité massale	15
2.3.3. Concentration	15
2.3.4. Dilution.....	15
2.3.5. Motilité individuelle.....	16
2.3.6. Coloration.....	16
2.3.7. Lutage des lames	16
2.3.8. Lecture des lames	17
2.3.9. Analyse des résultats	17
2.3.9.1. Liste des variables	17
2.3.9.2. Variables explicatives qualitatives : ANOVA	18
2.3.9.2.1. Modèle.....	18
2.3.9.2.2. Résolution du modèle.....	19
2.3.9.3. Variabilité inter-individuelle et intra-individuelle	20
3. Résultats	20
3.1.Lecture de lame	20
3.2.Résultats bruts	22
3.2.1. Déroulement des prélèvements	22
3.2.2. Moyennes générales et distribution des résultats	22
3.3.Etude du pourcentage de spermatozoïdes morts	23
3.3.1. Analyse statistique.....	23
3.3.2. Effet de l'interaction entre dilueur et colorant	24
3.3.3. Effet de l'interaction entre dilueur et quantité de dilueur ajouté par mL d'éjaculat pur.....	25
3.3.4. Effet lecteur	25
3.3.5. Relation avec la motilité.....	26
3.3.5.1. Motilité massale	26
3.3.5.2. Motilité individuelle.....	27
3.3.6. Conclusion partielle : pourcentage de spermatozoïdes morts	29

3.4. Etude du pourcentage d'anomalies morphologiques	30
3.4.1. Variables exploitées	30
3.4.2. Résultats bruts	30
3.4.3. Pourcentage d'anomalies majeures	31
3.4.3.1. Effet de l'interaction entre dilueur et colorant	31
3.4.3.2. Effet de l'interaction entre dilueur, colorant et lecteur	31
3.4.3.3. Effet de la quantité de dilueur ajouté par mL d'éjaculat pur.....	32
3.4.3.4. Effet de l'interaction entre taureau et éjaculat	32
3.4.3.5. Conclusion partielle : pourcentage d'anomalies majeures.....	32
3.4.4. Pourcentage d'anomalies mineures	33
3.4.4.1. Réflexion	33
3.4.4.2. Résultats de l'ANOVA.....	33
3.4.4.3. Pourcentage de queues repliées ou enroulées à l'extrémité (QR).....	34
3.4.4.3.1. Effet de l'interaction entre dilueur et colorant	34
3.4.4.3.2. Effet de l'interaction entre lecteur et colorant.....	34
3.4.4.4. Pourcentage d'anomalies mineures sans queues repliées ou enroulées à l'extrémité (Amin sans QR)	34
3.4.4.4.1. Effet de l'interaction entre dilueur et colorant	34
3.4.4.4.2. Effet de la quantité de dilueur ajouté par mL d'éjaculat pur.....	35
3.4.4.4.3. Effet taureau et éjaculat.....	35
3.4.4.5. Conclusion partielle : pourcentage de QR et d'anomalies mineures sans QR	36
4. Discussion.....	37
4.1. Matériels et méthodes.....	37
4.2. Pourcentage de spermatozoïdes morts	38
4.3. Pourcentage d'anomalies morphologiques.....	41
5. Conclusion.....	44
6. Annexes	44
6.1. Mode d'emploi des colorants	44
6.2. Résultats bruts	44
7. Bibliographie.....	49

Table des figures

Figure 1: Anomalies morphologiques de spermatozoïdes de taureau, classification de Blom (1973) simplifiée par Ott (1986) et modifiée par Dumont (1997) (Dumont, 1997).....	17
Figure 2 : Moyennes des pourcentages de spermatozoïdes morts en fonction du dilueur et du colorant.....	24
Figure 3 : Moyennes des pourcentages de spermatozoïdes morts en fonction du dilueur et de la quantité de dilueur ajoutée en mL par mL d'éjaculat pur	25
Figure 4 : Moyennes des pourcentages de spermatozoïdes morts - effet lecteur de lame, dilueur et colorant.....	26
Figure 5 : Motilité individuelle en fonction de la motilité massale - effet dilueur.	27
Figure 6 : Moyennes des pourcentages de spermatozoïdes morts en fonction de la motilité individuelle - effet dilueur et colorant.....	28

Table des tableaux

Tableau 1 : Caractéristiques des taureaux inclus dans l'étude.....	14
Tableau 2 : Récapitulatif des dilutions des aliquotes.	16
Tableau 3 : Liste des variables.	18
Tableau 4 : Correspondance entre les valeurs des variables qualitative QdilmLq et quantitative QdilmL.	19
Tableau 5 : Principales caractéristiques des lames lues.	20
Tableau 6 : Images des lames lues.	21
Tableau 7 : Statistiques descriptives des paramètres séminologiques de l'étude.	22
Tableau 8 : Résultats de l'analyse statistique, variable réponse = racine carrée du pourcentage de spermatozoïdes morts.	24
Tableau 9 : Effet du colorant et du dilueur sur le pourcentage de spermatozoïdes morts (résultats en moyenne \pm écart type ; n = 64 pour chaque case Dil*Col).....	24
Tableau 10 : Effet du dilueur et de la quantité de dilueur ajouté sur le pourcentage de spermatozoïdes morts (résultats en moyenne \pm écart type).....	25
Tableau 11 : Effet du lecteur de lame sur le pourcentage de spermatozoïdes morts (résultats en moyenne \pm écart-type ; n = 32 pour chaque case LectL*couple (Dil*Col)).	26
Tableau 12 : Somme du pourcentage de spermatozoïdes colorés et du pourcentage de spermatozoïdes motiles en fonction du pourcentage de spermatozoïdes colorés (résultats en moyenne \pm écart-type).....	29
Tableau 13 : Résultats de l'ANOVA relative aux anomalies morphologiques	30
Tableau 14 : Pourcentages d'anomalies majeures en fonction du dilueur et du colorant (résultats en moyenne \pm écart-type, n=64 pour chaque case Dil*Col).....	31
Tableau 15 : Pourcentages d'anomalies majeures en fonction du dilueur, du colorant et du lecteur de lame (résultats en moyenne \pm écart-type, n=36 pour chaque case Dil*Col*LectL).	31
Tableau 16 : Pourcentages d'anomalies majeures en fonction de la quantité de dilueur ajouté par mL d'éjaculat (résultats en moyenne \pm écart-type).....	32
Tableau 17 : Pourcentages d'anomalies majeures en fonction du taureau et de l'éjaculat (résultats en moyenne \pm écart-type, n=16 pour chaque case Taur*Ejac).....	32
Tableau 18 : Résultats de l'ANOVA relative aux pourcentages de queues repliées ou enroulées à l'extrémité (QR) et aux anomalies mineures sans QR (Amin sans QR).....	33
Tableau 19 : Pourcentages de queues repliées ou enroulées à l'extrémité (QR) en fonction du dilueur et du colorant (résultats en moyenne \pm écart-type, n=64 pour chaque case Dil*Col).	34
Tableau 20 : Pourcentages de queues repliées ou enroulées à l'extrémité (QR) en fonction du colorant et du lecteur de lame (résultats en moyenne \pm écart-type, n=64 pour chaque case LectL*Col).	34

Tableau 21 : Pourcentages d'anomalies mineures sans queues repliées ou enroulées à l'extrémité (Amin sans QR) en fonction du dilueur et du colorant (résultats en moyenne \pm écart-type, n=64 pour chaque case Dil*Col).....	35
Tableau 22 : Pourcentage d'anomalies mineures sans queues repliées ou enroulées à l'extrémité (Amin sans QR) en fonction de la quantité de dilueur ajouté par mL d'éjaculat pur (résultats en moyenne \pm écart-type).	35
Tableau 23 : Pourcentage d'anomalies mineures sans QR en fonction du taureau (Taur) et du numéro d'éjaculat (Ejac), (résultats en moyenne \pm écart-type, n=16 pour chaque case Taur*Ejac).....	35
Tableau 24 : Osmolarité et variations d'osmolarité des aliquotes lors de la coloration (en mOsm/kg).....	39
Tableau 25 : Résultats bruts de l'étude. Les anomalies morphologiques sont données en nombre sur 200 spermatozoïdes comptés.....	45

Liste des abréviations

AA = acrosome anormal,
AB = acrosome en bouton,
Amaj = anomalie majeure,
Amin = anomalie mineure,
ANOVA = ANalysis Of VAriance,
Col = colorant,
Conc = concentration de l'éjaculat en 10^9 /mL,
CR = cratère,
Dil = dilueur,
Ejac = numéro d'éjaculat,
FD = forme double ou mal développée,
GD = gouttelette cytoplasmique distale,
GP = gouttelette cytoplasmique proximale,
IA = implantation abaxiale,
KVE = Kit Vita-Eosine®,
LectL = lecteur de lame,
Mind = motilité individuelle,
Mmas = motilité massale,
NspzM = pourcentage de spermatozoïdes morts,
PBS = DBPS no calcium no magnesium®,
PI = déformation de la pièce intermédiaire,
QdilmL = quantité de dilueur ajouté par mL d'éjaculat,
QdilmLq = quantité de dilueur ajouté par mL d'éjaculat divisé en 5 catégories,
QE = queue enroulée autour de la tête,
QR = queue repliée ou enroulée à l'extrémité,
RP = rupture partielle du cou,
TA = tête pyriforme ou amincie à la base ou avec crêtes nucléaires ou repliée,
Taur = taureau,
TD = tête normale sans queue,
TE = tête étroite, petite ou géante,
TotA = anomalies morphologiques,
VitalStain = Sperm VitalStain®,
Vol = volume de l'éjaculat en mL,

1. Introduction

L'insémination artificielle s'est développée en France au début des années 1950 et représente aujourd'hui la plus ancienne et la plus répandue des biotechnologies de la reproduction : elle concerne plus de la moitié des vaches du cheptel national toutes races confondues (Gérard et al., 2008 ; France Génétique Elevage, 2015). Malgré tout, la monte naturelle reste la première méthode de reproduction en élevage allaitant en France mais aussi dans le monde (Chenoweth, 2004). La réussite de la reproduction dans les systèmes d'élevage en monte naturelle repose sur de nombreux critères dont, bien évidemment, l'aptitude à la reproduction des femelles, mais plus particulièrement l'aptitude des taureaux à posséder une libido suffisante, à effectuer correctement le saut, et à produire de la semence de bonne qualité (Parkinson, 2004). La stérilité ou l'infertilité du taureau pouvant avoir des répercussions dramatiques sur le bilan technico-économique du troupeau, un examen de la fonction sexuelle du reproducteur est recommandé en cas d'achat d'un nouveau taureau, avant la période de mise à la reproduction, ainsi que lors de pathologie génitale ou extra génitale, voire lors de suspicion de la part de l'éleveur (Dumont, 1997).

Qu'il s'agisse de taureaux de monte naturelle ou producteurs de semence en centre d'insémination, le contrôle de la qualité de la semence repose sur les mêmes critères, seul les moyens techniques diffèrent (par exemple, utilisation d'un système CASA (Computer Assisted Semen Analysis) en centre d'insémination, trop cher à utiliser pour un vétérinaire praticien). Un examen clinique approfondi est bien sûr indispensable, avec une attention particulière aux organes reproducteurs, testicules, épидидymes, etc. puis une appréciation du comportement sexuel du taureau. La récolte du sperme à proprement parler permet d'une part d'obtenir une dose de semence fraîche à analyser et d'autre part d'observer le comportement du taureau lors du saut lorsqu'elle est effectuée à l'aide d'un vagin artificiel. Cependant cette méthode n'est pas conseillée pour des animaux difficiles à manipuler ou incapables de sauter sur lesquels on préférera utiliser un électroéjaculateur (Dumont, 1997 ; Parkinson, 2004 ; Arthur, 2001 ; Barth, 2006 ; Chenoweth, 2002).

L'examen de la semence débute par une appréciation visuelle du volume de l'éjaculat, de sa couleur, de son opacité, de la présence de corps étrangers. S'en suit la lecture de la concentration (généralement par spectrophotométrie, ou comptage manuel à l'aide d'un hémacytomètre) puis de la motilité massale, c'est-à-dire de l'évaluation de l'intensité des vagues produites par le mouvement des spermatozoïdes, au microscope optique à platine chauffante. La dilution, compte tenu de la forte concentration du sperme frais de ruminant, est quasi obligatoire pour l'appréciation de la motilité individuelle, du pourcentage de spermatozoïdes vivants et du pourcentage d'anomalies morphologiques (Dumont, 1997 ; Arthur, 2001 ; Chenoweth, 2002 ; Parkinson, 2004 ; Barth, 2006).

Il existe actuellement une large gamme de dilueurs commerciaux, renfermant tous, entre autres, des antibiotiques (Gérard et al., 2008), plus une part propre à chaque producteur. Le rôle premier des dilueurs est la conservation de la semence en maintenant sa fertilité (quantité et qualité des spermatozoïdes). Pour cela, de nombreux essais ont été réalisés pour identifier un ou plusieurs additifs (tels que lait de vache, jaune d'œuf, lécithine de soja) possédant un

effet protecteur pour les spermatozoïdes en réduisant les dommages cellulaires, notamment lors de la phase de congélation-décongélation de la semence (Amirat et al., 2004). Parmi eux, l'Optidyl®, dilueur commercial, est actuellement très largement utilisé par les centres d'insémination bovine en France (Amirat et al., 2005) pour diluer la semence et, de ce fait, est aisément accessible aux praticiens. Cependant, sa composition à base de jaune d'œuf présente l'inconvénient d'en faire un support possiblement variable et comportant un risque sanitaire lors de la préparation de paillettes (Gérard et al., 2008).

Le pourcentage de spermatozoïdes vivants s'estime par l'appréciation de l'intégrité membranaire en analysant, par exemple, la perméabilité de cette membrane à certains colorants (Barth, 2006 ; Silva, 2006 ; Mayer et al., 1951). Il existe de nombreuses techniques de coloration disponibles sur le marché qui remplissent cette fonction, parmi lesquelles la coloration dite "vitale" à l'éosine-nigrosine utilisée depuis les années 50 ; le principe de cette technique est d'utiliser un colorant qui ne traverse que les membranes des cellules mortes (ici l'éosine) pour se lier et colorer l'ADN et un autre colorant de fond qui facilite la lecture (ici la nigrosine). C'est une technique facile à mettre en œuvre, rapide et peu coûteuse qui permet à la fois d'évaluer la viabilité des spermatozoïdes ainsi que le pourcentage d'anomalies morphologiques. La coloration vitale à base d'éosine nécessite une concentration élevée de l'ordre de 1 à 10g/L pour évaluer en microscopie optique son exclusion des cellules, cependant, à un dosage de 7g/L, il a été montré qu'elle était toxique pour des spermatozoïdes humains et entraînait une sous-évaluation de la proportion des cellules vivantes ((Eliasson, Treichl, 1971) cité par (Björndahl et al., 2004)).

De nombreuses publications ont porté sur l'utilisation des données d'évaluation de la semence comme valeur prédictive de la fertilité (Sellem et al., 2015), certaines remettant en question la validité de l'appréciation du paramètre 'fertilité' (Mocé, Graham, 2008), trop dépendant de nombreux autres facteurs, notamment de l'aptitude de la femelle inséminée à concevoir. Par ailleurs, peu d'études ont porté sur les biais de l'évaluation de la semence, en particulier liés à la méthode. Déjà, la question de l'effet du dilueur et/ou du colorant ou de leur interaction sur le pourcentage de spermatozoïdes morts avait été soulevée par une équipe de pathologie de la reproduction de l'ENVT qui avait observé des résultats discordants entre une motilité massale et individuelle satisfaisante et un pourcentage de spermatozoïdes morts proche de 100% après dilution et coloration de semence de taureau (Esteban-Gil et al., 2014).

L'objectif de notre étude est d'évaluer et de quantifier l'effet du dilueur et du colorant sur le pourcentage de spermatozoïdes morts et d'anomalies morphologiques dans la semence fraîche de taureau. Pour cela, on se propose de comparer les pourcentages de spermatozoïdes morts et les pourcentages d'anomalies morphologiques dilués avec de l'Optidyl® (IMV Technologies, L'aigle, France) ou un tampon phosphate compatible pour cultures cellulaires (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EU) puis de les colorer à l'aide de deux colorants commerciaux à base d'éosine-nigrosine, différents par leurs méthodes d'application.

2. Matériels et méthodes

2.1. Taureaux

Quatre taureaux (Taur) de race Prim'holstein (PH) ou Blonde d'Aquitaine (BA), de moyenne d'âge 1 an et demi, en production de semence depuis au moins 4 mois à la taurellerie de Midatest à Soual ont été prélevés quatre fois au cours de l'étude (éjaculat 1 (Ejac) : 27/01/15, éjaculat 2 : 30/01/15, éjaculat 3 : 03/02/15 et éjaculat 4 : 06/02/15). Ces taureaux étaient entretenus dans les conditions habituelles de la station : box individuel, ration à base de foin complétée par 3 à 5kg de concentrés par jour. La fréquence de récolte est de 2 sauts, 2 fois par semaine pour les 2 plus jeunes, et de 1 saut, 2 fois par semaine pour les plus âgés. Aucun antécédent de pathologie générale ou de la reproduction n'a été rapporté. Ces informations sont résumées dans le Tableau 1.

Tableau 1 : Caractéristiques des taureaux inclus dans l'étude.

Nom	Race	Date de naissance	Age au moment de la récolte	Date de début de collecte	Fréquence de collecte	Antécédents
Taur 1 ITGUENOT	PH	03/11/13	1 an 3 mois	23/09/2014	2 X semaine (2 sauts)	RAS
Taur 2 IDEFIX	BA	04/05/13	1 an 9 mois	24/07/2014	2 X semaine (1 sauts)	RAS
Taur 3 IODA	PH	21/11/13	1 an 2 mois	23/09/2014	2 X semaine (2 sauts)	RAS
Taur 4 ISPAHAN	BA	29/01/13	2 ans	27/06/2014	2 X semaine (1 sauts)	RAS

PH : Prim'Holstein, BA : Blonde d'Aquitaine, RAS : rien à signaler.

2.2. Récolte

La récolte a été effectuée, selon le protocole habituel, au vagin artificiel, avec des paramètres de calibre/pression/température adaptés à chaque taureau, par des animaliers expérimentés et habitués à manipuler ces animaux. Les taureaux attendent leur tour dans des stalles face à la salle de monte de manière à stimuler leur libido par "voyeurisme" et par simple conditionnement. Ils sont ensuite emmenés près du bœuf en train et doivent effectuer un certain nombre de « fausses montes » avant de donner le coup de rein concomitant à l'éjaculation. Le sperme récolté est tout de suite transmis au laboratoire de contrôle de la semence qui juxte la salle et étiqueté.

2.3. Examen de la semence

2.3.1. Volume

La lecture du volume se fait immédiatement après éjaculation par lecture directe sur le tube à prélèvement gradué (type Falcon).

2.3.2. Motilité massale

Le plus rapidement possible après la récolte, une goutte de sperme pur est déposée sur une lame préalablement chauffée à 38°C (posée sur la platine chauffante) et observée au microscope optique à contraste de phase et à platine chauffante au grossissement 100 (Nikon, Japan) : l'intensité des vagues provoquées par le déplacement des spermatozoïdes est évaluée par un opérateur expérimenté et notée selon une échelle de 0 à 5 (Dumont, 1997) :

Note 0 : absence de mouvement des spermatozoïdes,

Note 1 : léger mouvement perceptible, pas de vague,

Note 2 : vagues peu nombreuses,

Note 3 : vagues nombreuses,

Note 4 : vagues rapides et intenses,

Note 5 : tourbillons très rapides.

2.3.3. Concentration

La concentration est évaluée par spectrophotométrie (Accuread, IMV, L'Aigle), selon les recommandations du fabricant. L'appareil est étalonné une fois par mois à l'aide d'un filtre étalon, et une fois par an grâce à une courbe étalon (le dernier en date au moment des manipulations : 22/10/14).

2.3.4. Dilution

Chaque éjaculat est ensuite divisé en 2 parties aliquotes, l'une étant diluée avec le dilueur employé à Midatest (Optidyl®, IMV Technologies, L'Aigle, France) l'autre par une solution de tampon phosphate (PBS) (DPBS no calcium no magnesium®, Thermo Fisher Scientific, Waltham, EU). La quantité de dilueur à ajouter à chaque partie aliquote varie entre chaque éjaculat pour des questions techniques, et est déterminée, à partir du 2^{ième} éjaculat par la formule suivante :

$$d = \left(\frac{v * c}{x} * 0,205 \right) - v$$

d = quantité de dilueur à rajouter à l'éjaculat (mL),

v = volume de l'éjaculat (mL),

c = concentration de l'éjaculat (10⁶/mL),

x = nombre de spermatozoïdes par paillette (10⁶), propre à chaque taureau, et calculé au début de la saison de monte selon les résultats post-décongélation de la semence.

Les dilutions effectuées sont résumées dans le Tableau 2. Les dilueurs utilisés sont maintenus à 38°C au bain marie de même que le prélèvement de sperme est conservé dans un bain sec de manière à éviter au maximum les chocs thermiques.

Tableau 2 : Récapitulatif des dilutions des aliquotes.

Taur	x	Ejac 1		Ejac 2		Ejac 3		Ejac 4	
		Q. 40 μ L	Q. 10 ⁸ spz	Q. 40 μ L	Q. 10 ⁸ spz	Q. 40 μ L	Q. 10 ⁸ spz	Q. 40 μ L	Q. 10 ⁸ spz
Taur 1	18	0,75	1,08	0,81	1,09	1,02	1,10	0,63	1,07
Taur 2	22	0,75	1,51	0,53	0,87	0,69	0,88	0,38	0,84
Taur 3	20	0,68	1,07	0,50	0,95	0,69	0,97	0,72	0,97
Taur 4	22	0,75	1,17	0,36	0,84	0,46	0,86	0,11	0,68

x : nombre de spermatozoïdes (en millions par paillette) Q. 40 μ L : quantité de dilueur ajouté en mL à 40 μ L d'éjaculat pur ; Q. 10⁸ spz : quantité de dilueur ajouté en mL à 10⁸ spermatozoïdes.

2.3.5. Motilité individuelle

La lecture est réalisée par un opérateur expérimenté au microscope à contraste de phase et à platine chauffante (Nikon, Japon) après dépôt d'une goutte de sperme dilué entre lame et lamelle préalablement chauffées à 38°C, au grossissement 200 par évaluation de la proportion de spermatozoïdes fléchants (qui traversent le champ du microscope relativement rapidement de manière rectiligne). Les spermatozoïdes se déplaçant lentement, sur place ou en cercle ne sont pas considérés comme mobiles. Une note de 1 à 5 est attribuée avec :

- Note 1 : 0-20% de spermatozoïdes fléchants,
- Note 2 : 20-40% de spermatozoïdes fléchants,
- Note 3 : 40-60% de spermatozoïdes fléchants,
- Note 4 : 60-80% de spermatozoïdes fléchants,
- Note 5 : 80-100% de spermatozoïdes fléchants.

2.3.6. Coloration

Chaque partie aliquote diluée est ensuite divisée en deux, chacune étant colorée à l'aide du Kit Vita-Eosine® (RAL Diagnostics, Martillac, France) (KVE) ou du Sperm VitalStain® (Nidacon, Mölndal, Suède) (VitalStain) selon les recommandations du fabricant (cf. annexes page 44).

Les tubes Eppendorf ainsi que les colorants et les tubes de sperme dilué sont maintenus à température corporelle dans un bain, les lames étaient placées sur la platine chauffante du microscope avant étalement du frottis de manière à éviter les chocs thermiques lors de la préparation.

2.3.7. Lutage des lames

Immédiatement après séchage des frottis réalisés, une goutte d'histolaque (Labo-moderne, Paris, France) est appliquée sur la face colorée, puis une lamelle y est déposée en exerçant une

certaines pressions de manière à repousser l'excédent d'histoloque vers les bords de la lame. Toutes les lames sont ensuite mises à sécher avant lecture.

2.3.8. Lecture des lames

Les lames sont lues au service de Pathologie de la reproduction de l'ENVN, à l'aide d'un microscope optique (Eclipse E200, Nikon, Japon), au grossissement x1000 (oculaire 10, objectif 100 à l'immersion) dans les jours qui suivent leur réalisation. Une appréciation générale de la qualité de la lame est effectuée, puis un comptage des spermatozoïdes morts (c'est-à-dire les spermatozoïdes dont la tête est colorée en rose par l'éosine qui pénètre aux travers des membranes plasmiques altérées) sur 200 spermatozoïdes observés de manière aléatoire sur la lame ainsi qu'un dénombrement des anomalies morphologiques sur ces mêmes 200 spermatozoïdes lus à l'aide de la classification de Blom (1973), simplifiée par Ott (1986) et modifiée par Dumont (1997) (cf. Figure 1).

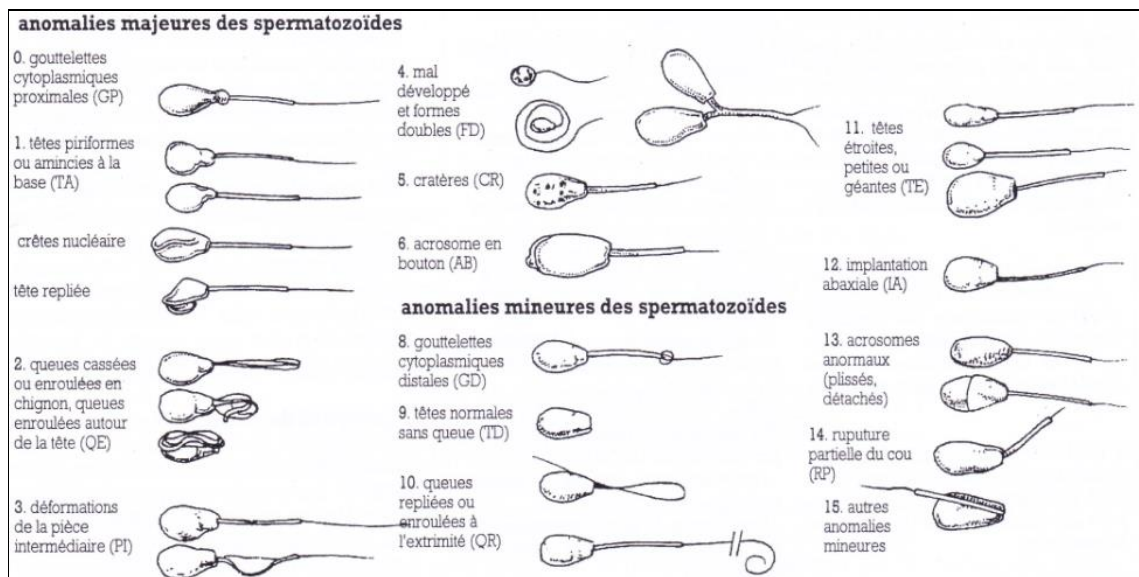


Figure 1: Anomalies morphologiques de spermatozoïdes de taureau, classification de Blom (1973) simplifiée par Ott (1986) et modifiée par Dumont (1997) (Dumont, 1997).

Lorsque plusieurs anomalies sont présentes sur le même spermatozoïde, elles sont comptabilisées de manière indépendante. Deux lames par couple éjaculat/taureau/dilueur/colorant sont lues par deux lecteurs différents, l'un novice, l'autre expérimenté, sans communications des résultats avant la fin des lectures, soit un total de $n = 4 \times 4 \times 2 \times 2 \times 2 \times 2 = 256$ lames lues.

2.3.9. Analyse des résultats

2.3.9.1. Liste des variables

La liste des variables et de leurs abréviations est présentée dans le Tableau 3.

Tableau 3 : Liste des variables.

Variables explicatives		
Abréviation	Signification	Type
Ejac	Numéro d'éjaculat	qualitative
Taur	Taureau	qualitative
Vol	Volume en mL	quantitatif
Conc	Concentration de l'éjaculat en 10 ⁹ /mL	quantitative
Dil	Dilueur	qualitative
Col	Colorant	qualitative
LectL	Lecteur de lame	qualitative
QdilmL	Quantité de dilueur ajouté en mL par mL d'éjaculat	quantitative
Mmas	Motilité massale	quantitative
Mind	Motilité individuelle	quantitative
LectM	Lecteur de motilité	quantitatif
Variables à expliquer		
Abréviation	Signification	Type
<u>NspzM</u>	Pourcentage de spermatozoïdes morts	quantitative
GP	Gouttelette cytoplasmique proximale	quantitative
TA	Tête pyriforme ou amincie à la base ou avec crêtes nucléaires ou repliée	quantitative
QE	Queue enroulée autour de la tête	quantitative
PI	Déformation de la pièce intermédiaire	quantitative
FD	Formes doubles ou mal développé	quantitative
CR	Présence de cratères	quantitative
AB	Acrosome en bouton	quantitative
Amaj	Anomalies majeures	quantitative
GD	Gouttelette cytoplasmique distale	quantitative
TD	Tête normale sans queue	quantitative
QR	Queue repliée ou enroulée à l'extrémité	quantitative
TE	Tête étroite, petite ou géante	quantitative
IA	Implantation abaxiale	quantitative
AA	Acrosome anormal	quantitative
RP	Rupture partielle du cou	quantitative
Autre	Autre anomalie morphologique mineure	quantitative
Amin	Anomalies mineures	quantitative
TotA	Anomalies morphologiques	quantitative

2.3.9.2. Variables explicatives qualitatives : ANOVA

2.3.9.2.1. Modèle

Préalablement à l'analyse statistique :

- les valeurs de la variable NspzM sont lissées par la racine carrée pour devenir la variable rNspzM utilisée dans le modèle,
- les valeurs des variables des anomalies morphologiques utilisées dans le modèle sont celles des anomalies morphologiques transformées par la formule $\log(1+AM)$ (avec $AM = n$ n'importe quelle anomalie morphologique),
- la variable quantitative QdilmL est transformée en la variable qualitative QdilmLq par segmentation de ses valeurs. Les seuils sont donnés dans le Tableau 4.

Tableau 4 : Correspondance entre les valeurs des variables qualitative QdilmLq et quantitative QdilmL.

QdilmLq	QdilmL (en mL)
1	<5
2	[5-10[
3	[10-15[
4	[15-20[
5	≥20

Les variables quantitatives à expliquer sont analysées par l'étude de la variance (ANOVA) selon le modèle suivant :

$$Y_{ijklmn} = \mu + \text{Taur}_i + \text{Ejac}_j + \text{Dil}_k + \text{Col}_l + \text{LectL}_m + \text{QdilmLq}_n + \text{Taur}_i * \text{Ejac}_j + \text{Dil}_k * \text{Col}_l + \text{Dil}_k * \text{QdilmLq}_n + \text{Dil}_k * \text{Col}_l * \text{LectL}_m + \varepsilon$$

Avec :

Y_{ijklmn} = est la variable à expliquer pour le taureau i, l'éjaculat j, le dilueur k, la quantité de dilueur ajouté n, le colorant l, lu par le lecteur m,

μ = l'effet moyen général,

Taur_i = effet taureau, $i \in [1;4]$,

Ejac_j = effet numéro d'éjaculat, $j \in [1;4]$,

Dil_k = effet dilueur, $k \in [1;2]$,

Col_l = effet colorant, $l \in [1;2]$,

LectL_m = effet du lecteur de lame, $m \in [1;2]$,

QdilmLq_n = effet de la quantité de dilueur ajouté, $n \in [1;5]$,

ε = résidu.

Le symbole * représente l'effet de l'interaction entre deux (ou plus) variables explicatives.

2.3.9.2.2. Résolution du modèle

La résolution du modèle se fera à l'aide du logiciel R (R Development Core Team (2008). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria).

2.3.9.3. Variabilité inter-individuelle et intra-individuelle

Nous nous sommes efforcés de limiter au maximum la variabilité inter-individuelle (Taur) en choisissant des taureaux reconnus de bonne qualité, d'âge équivalent et de limiter au maximum la variabilité intra-individuelle (Taur*Ejac) en récoltant les taureaux sur une période courte (2 semaines), dans des conditions similaires et avec le même intervalle de collection. De ce fait, on s'attend à avoir des pourcentages de spermatozoïdes morts ou anormaux qui varient assez peu entre les taureaux et les éjaculats. De plus l'objectif de l'étude étant de mettre en évidence l'effet du dilueur et du colorant sur le pourcentage de spermatozoïdes morts et sur le pourcentage d'anomalies morphologiques, nous ne présenterons pas nos résultats Taur*Ejac et Taur à moins qu'ils ne soient pertinents.

3. Résultats

3.1. Lecture de lame

Le Tableau 5 résume les principales caractéristiques des lames lues, évaluées de manière subjective selon les notations – (mauvais), +/- (moyen), ou + (bon) par les deux lecteurs après lecture de toutes les lames : qualité de l'étalement (uniformité de la répartition de la coloration et des spermatozoïdes), coloration de fond (intensité de la coloration, ni trop clair, ni trop foncé), distinction entre les morts et les vivants (facilité de lecture entre une tête de spermatozoïde mort et une tête de spermatozoïde vivant).

Tableau 5 : Principales caractéristiques des lames lues.

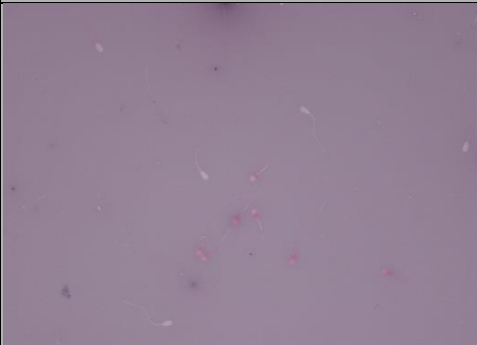
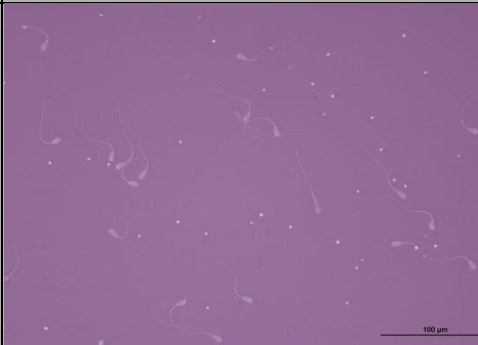


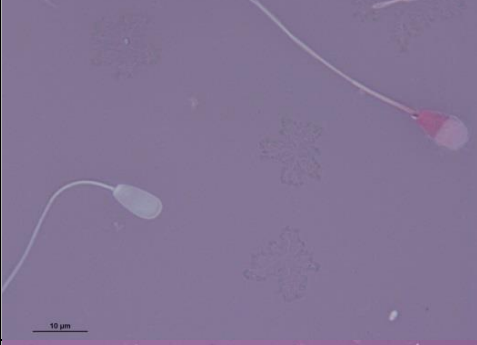

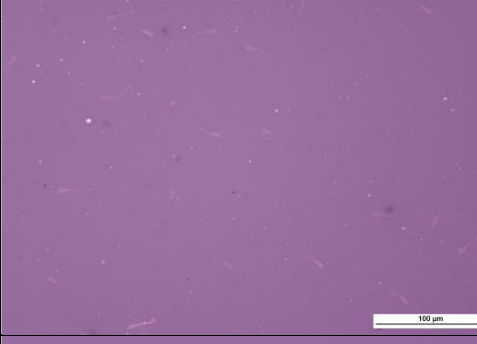
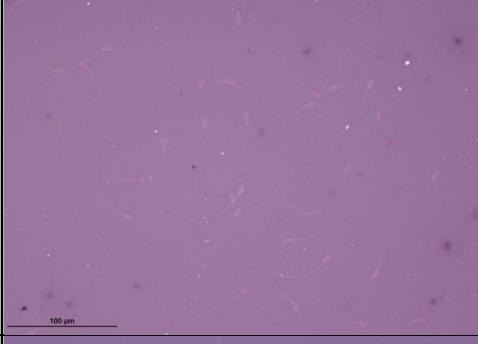
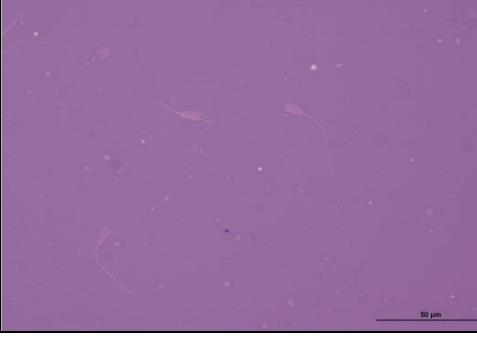
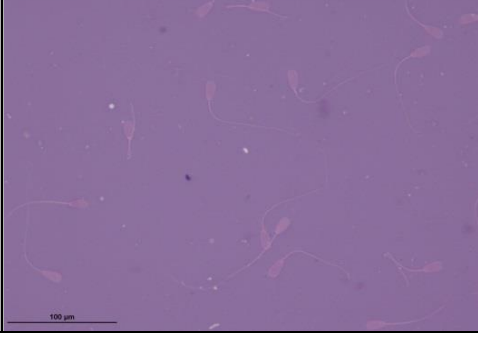
	Kit Vita-Eosine	Sperm VitalStain
Optidyl®	Qualité de l'étalement : -	Qualité de l'étalement : -
	Coloration de fond : -	Coloration de fond : +/-
	Distinction morts/vivants : -	Distinction morts/vivants : -
PBS	Qualité de l'étalement : -	Qualité de l'étalement : +/-
	Coloration de fond : -	Coloration de fond : +/-
	Distinction morts/vivants : +	Distinction morts/vivants : +

+ = bon ; +/- = moyen, - = mauvais

On remarque que la distinction entre spermatozoïdes morts et spermatozoïdes vivants est beaucoup plus aisée avec le dilueur PBS qu'avec l'Optidyl® quel que soit le colorant. De même, les caractéristiques des lames lues sont meilleures avec le colorant VitalStain qu'avec le KVE.

Le Tableau 6 présente des photographies des lames de l'étude, obtenues à l'aide d'un microscope optique équipé d'un appareil photo, aux objectifs x20, x40 et x100 (soit aux grossissements x200, x400 et x1000).

Tableau 6 : Images des lames lues.

Dilueur	Grossissement	Colorant	
		KVE	VitalStain
PBS	x200		
	x400		
	x1000		
Optidyl®	x200		
	x400		



3.2. Résultats bruts

3.2.1. Déroulement des prélèvements

Il n'y a eu aucune difficulté lors de la récolte de l'éjaculat et de l'examen des lames mis à part :

- L'éjaculat du taureau 3 récolté le 30/02/2015 (2^{ième} récolte) provient du 2^{ième} saut, avec une préparation au saut entre le 1^{ier} et le 2^{ième} saut de manière habituelle (Vol = 3,2 mL, Conc = 1,307 10⁹/mL).
- L'éjaculat du taureau 4 récolté le 06/02/15 (4^{ième} récolte) provient du 1^{ier} saut mais avec une préparation au saut trop brève (Vol = 1,9 mL, Conc = 0,40 10⁹/mL).

Les résultats bruts sont présentés en annexe (page 44).

3.2.2. Moyennes générales et distribution des résultats

Le Tableau 7 présente les paramètres séminologiques obtenus après les quatre éjaculations des quatre taureaux de l'étude.

Tableau 7 : Statistiques descriptives des paramètres séminologiques de l'étude.

Paramètre	Unité	Moyenne	Ecart-type	Min	Max
Vol	mL	4,34 ± 1,51		1,9	7,8
Conc	10 ⁹ /mL	1,51 ± 0,43		0,4	2,32
Mmas	∅	3,8 ± 0,5		2	4,5
Mind	∅	3,4 ± 0,7		1	4,5
NspzM	%	26,28 ± 20,42		4	87
GP	/200 comptés	2,59 ± 3,31		0	20
TA	/200 comptés	1,84 ± 2,85		0	32
QE	/200 comptés	4,43 ± 6,12		0	55
PI	/200 comptés	2,87 ± 5,78		0	62
FD	/200 comptés	0,51 ± 0,84		0	6
CR	/200 comptés	0,04 ± 0,22		0	2

AB	/200 comptés	0,13	±	0,40	0	3
Amaj	/200 comptés	12,41	±	9,16	2	71
GD	/200 comptés	1,52	±	3,59	0	36
TD	/200 comptés	3,01	±	2,59	0	18
QR	/200 comptés	38,18	±	43,70	0	148
TE	/200 comptés	0,70	±	0,92	0	4
IA	/200 comptés	0,03	±	0,16	0	1
AA	/200 comptés	0,40	±	1,10	0	10
RP	/200 comptés	0,37	±	0,70	0	4
Autre	/200 comptés	0,36	±	0,75	0	5
Amin	/200 comptés	44,57	±	42,54	1	150
TotA	/200 comptés	56,98	±	43,82	5	168

Vol = volume de l'éjaculat, Conc = concentration de l'éjaculat, Mmas = motilité massale, Mind = motilité individuelle, NspzM = pourcentage de spermatozoïdes morts, GP = gouttelette cytoplasmique proximale, TA = tête pyriforme ou amincie à la base ou avec crêtes nucléaires ou repliée, QE = queue enroulée autour de la tête, PI = déformation de la pièce intermédiaire, FD = forme double ou mal développée, CR = cratères, AB = acrosome en bouton, Amaj = anomalies majeures, GD = gouttelette cytoplasmique distale, TD = tête normale sans queue, QR = queue repliée ou enroulée à l'extrémité, TE = tête étroite, petite ou géante, IA = implantation abaxiale, AA = acrosome anormal, RP = rupture partielle du cou, Autre = autre anomalie morphologique mineure, Amin = anomalies mineures, TotA = anomalies morphologiques.

Ces résultats nous indiquent que le sperme récolté est d'assez bonne qualité avec un volume moyen à 4,34 mL pour une concentration moyenne de $1,51 \times 10^9$ /mL, une motilité massale moyenne à 3,8 et une motilité individuelle moyenne à 3,4. De même, la moyenne des sommes d'anomalies majeures ne dépasse pas 15%, et la moyenne des sommes de toutes les anomalies reste inférieure à 30% (caractéristiques séminologiques moyennes du taureau : volume = 4mL (2-10), concentration = $1,25 \times 10^9$ /mL (0,6-2,8), motilité individuelle $\geq 3,5$, pourcentage de spermatozoïdes normaux $\geq 70-75\%$ (Arthur, 2001)).

3.3. Etude du pourcentage de spermatozoïdes morts

Les données proviennent de la lecture de 2 lames par lecteur, par couple dilueur/colorant, par taureau et par éjaculat, soit $n = 256$.

3.3.1. Analyse statistique

La Tableau 8 synthétise les résultats de l'ANOVA du modèle présenté page 18. On peut voir qu'il existe une interaction très significative ($p=10^{-16}$) entre le dilueur et le colorant. De même, il existe une interaction significative entre le type de dilueur et la quantité de dilueur ajoutée par mL d'éjaculat ($p<0,001$). On remarque qu'il n'y a pas d'effet du lecteur sur le pourcentage de spermatozoïdes morts ($p = 0,49$).

Tableau 8 : Résultats de l'analyse statistique, variable réponse = racine carrée du pourcentage de spermatozoïdes morts.

Response: rNspzM						
	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)	
fTaur	3	167.78	55.93	71.2357	< 2.2e-16	***
fEjac	3	43.34	14.45	18.4023	9.887e-11	***
fDil	1	729.34	729.34	928.9953	< 2.2e-16	***
fCol	1	331.32	331.32	422.0133	< 2.2e-16	***
fQdilmL	4	55.05	13.76	17.5287	1.453e-12	***
fLectL	1	0.36	0.36	0.4630	0.4969043	
fTaur:fEjac	5	87.01	17.40	22.1666	< 2.2e-16	***
fDil:fCol	1	151.33	151.33	192.7536	< 2.2e-16	***
fDil:fQdilmL	4	16.37	4.09	5.2128	0.0004899	***
fDil:fLectL	1	1.69	1.69	2.1571	0.1432850	
fCol:fLectL	1	0.15	0.15	0.1900	0.6633322	
fDil:fCol:fLectL	1	0.56	0.56	0.7156	0.3984703	
Residuals	229	179.78	0.79			

3.3.2. Effet de l'interaction entre dilueur et colorant

L'interaction entre dilueur et colorant est significative sur le pourcentage de spermatozoïdes morts ($p=10^{-16}$). Ceci est mis en évidence par l'analyse de nos résultats avec le couple PBS/KVE qui donne un pourcentage de spermatozoïdes morts significativement supérieur aux autres couples dilueur/colorant de l'étude (Tableau 9), avec une moyenne à $54,5 \pm 14,1$ contre des moyennes entre $11,5 \pm 4,3$ et $23,5 \pm 16,0$ et pour les autres couples. La Figure 2 expose la représentation graphique des résultats.

Tableau 9 : Effet du colorant et du dilueur sur le pourcentage de spermatozoïdes morts (résultats en moyenne \pm écart type ; $n = 64$ pour chaque case Dil*Col).

	KVE	VitalStain
Optidyl®	$15,7 \pm 7,8^A$	$11,5 \pm 4,3^A$
PBS	$54,5 \pm 14,1^B$	$23,5 \pm 16,0^A$

En exposant, des lettres différentes montrent des moyennes qui sont significativement différentes.

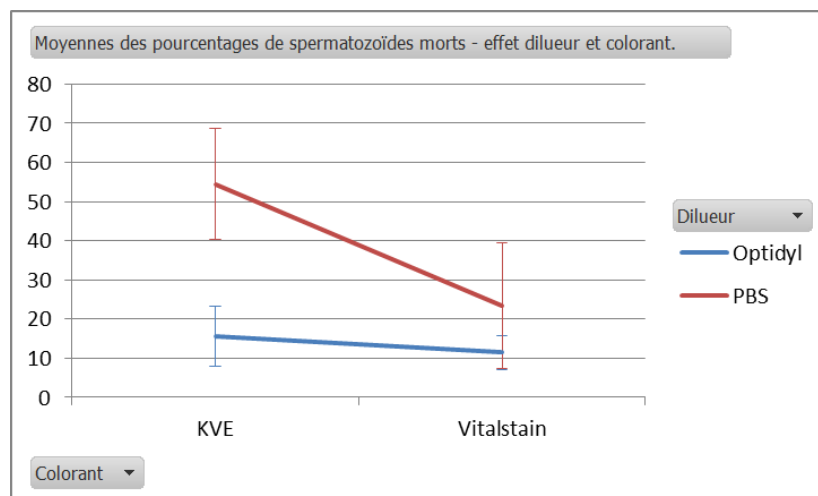


Figure 2 : Moyennes des pourcentages de spermatozoïdes morts en fonction du dilueur et du colorant. Remarquer le pourcentage significativement supérieur du couple KVE-PBS comparé aux autres couples.

3.3.3. Effet de l'interaction entre dilueur et quantité de dilueur ajouté par mL d'éjaculat pur

Il semble y avoir une relation significative du dilueur et de la quantité de dilueur ajouté par mL d'éjaculat pur avec (Tableau 10) :

- Pour chaque dilueur pris individuellement, la quantité ajoutée par mL d'éjaculat pur n'a pas d'effet significatif sur le pourcentage de spermatozoïdes morts.
- Pour chaque catégorie de dilution, le PBS donne des pourcentages de spermatozoïdes morts plus de deux fois supérieurs à ceux de l'Optidyl®, cependant ce résultat n'est significatif que pour les catégories 2 (dilution de 1:5 à 1:10) et 5 (dilution > 1:20). Concernant les autres catégories, les écart-types se recourent.

La Figure 3 propose la représentation graphique des moyennes et des écart-types.

Tableau 10 : Effet du dilueur et de la quantité de dilueur ajouté sur le pourcentage de spermatozoïdes morts (résultats en moyenne \pm écart type).

Catégorie	Quantité de dilueur ajouté en mL par mL d'éjaculat pur	Effectif des catégories	Optidyl®	PBS
1	<5mL	1xT4	14,1 \pm 4,2	30,5 \pm 18,7
2	[5-10[mL	1xT4, 1xT2	18,7 \pm 6,2 ^A	50,7 \pm 19,0 ^B
3	[10-15[mL	1xT2, 1xT3, 1xT4	12,9 \pm 4,4	33,6 \pm 23,0
4	[15-20[mL	2xT1, 2xT2, 3xT3, 1xT4	12,6 \pm 7,6	38,0 \pm 21,8
5	>20mL	2xT1	12,9 \pm 4,1 ^A	43,8 \pm 19,3 ^B

En ligne, les lettres capitales différentes montrent des moyennes qui sont significativement différentes.

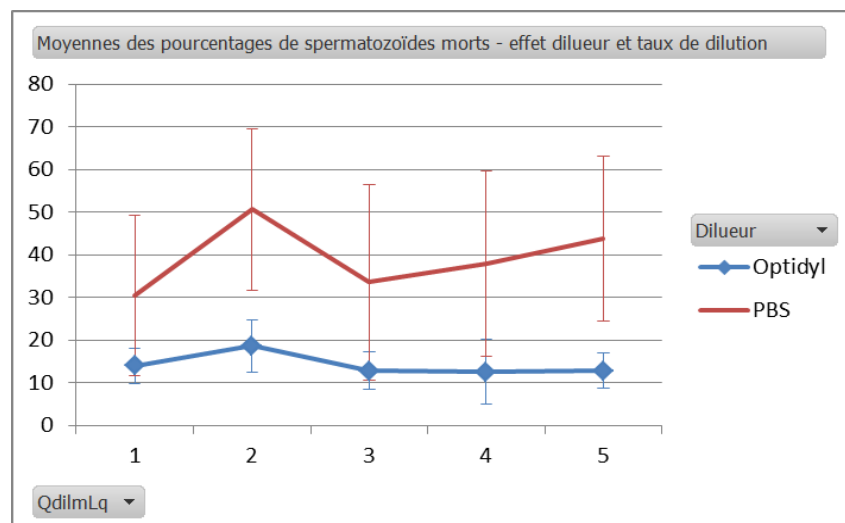


Figure 3 : Moyennes des pourcentages de spermatozoïdes morts en fonction du dilueur et de la quantité de dilueur ajoutée en mL par mL d'éjaculat pur. Remarquer les différences significatives entre une dilution au PBS et une dilution à l'Optidyl® pour une quantité de dilueur ajoutée par mL d'éjaculat de 5 à 10 mL (catégorie 2) et supérieure à 20mL (catégorie 5).

3.3.4. Effet lecteur

La colonne « Total » du Tableau 11 montre qu'il n'y a pas d'effet du lecteur sur le pourcentage de spermatozoïdes morts en accord avec les résultats de l'ANOVA (p = 0,49).

De plus, il ne semble pas y avoir d'interaction significative du lecteur de lame, du dilueur et du colorant sur le pourcentage de spermatozoïdes morts, puisque les différences observées ne dépendent pas du lecteur de lame mais uniquement du couple colorant-dilueur (Figure 4 et le Tableau 11). C'est ce qui avait été préalablement montré avec les résultats de l'ANOVA (page 24) où l'effet de l'interaction lecteur de lame*Dil*Col n'est pas significative ($p = 0,39$).

Tableau 11 : Effet du lecteur de lame sur le pourcentage de spermatozoïdes morts (résultats en moyenne \pm écart-type ; $n = 32$ pour chaque case LectL*couple (Dil*Col)).

	KVE - Optidyl®	KVE - PBS	VitalStain - Optidyl®	VitalStain - PBS	Total
Lecteur 1	15,1 \pm 7,6	55,8 \pm 13,1	11,6 \pm 4,2	24,0 \pm 15,7	26,6 \pm 20,7
Lecteur 2	16,2 \pm 8,0	53,1 \pm 15,2	11,3 \pm 4,5	23,1 \pm 16,6	25,9 \pm 20,2

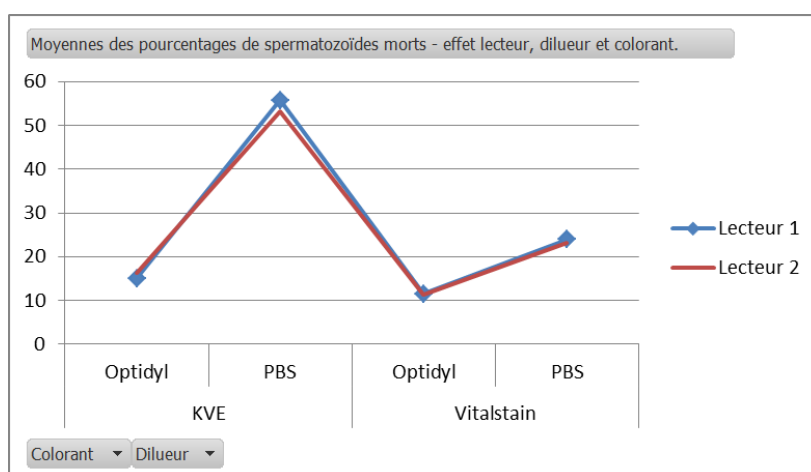


Figure 4 : Moyennes des pourcentages de spermatozoïdes morts - effet lecteur de lame, dilueur et colorant.

3.3.5. Relation avec la motilité

3.3.5.1. Motilité massale

La motilité massale dépend de plusieurs paramètres : la concentration de l'éjaculat, le pourcentage de spermatozoïdes motiles, la vitesse de progression des spermatozoïdes et la température (Barth, 2006). La motilité individuelle à la différence de la motilité massale est lue après dilution : elle dépend ainsi du dilueur utilisé (en supposant qu'il ait un effet sur la motilité des spermatozoïdes) et de la température uniquement. La température étant un paramètre contrôlé tout au long de l'étude, il est possible de comparer pour chaque valeur de motilité massale, les motilités individuelles associées obtenues après dilution avec le PBS et avec l'Optidyl®. Ceci est représenté dans la Figure 5. On observe qu'il y a une corrélation positive entre motilité individuelle après dilution à l'Optidyl® ou au PBS et motilité massale. De plus, en moyenne la motilité individuelle après dilution à l'Optidyl® est meilleure qu'après dilution au PBS. Ceci pourrait s'expliquer par :

- Une mauvaise estimation de la motilité individuelle ou de la motilité massale, ce qui semble peu probable compte tenu de l'expérience des opérateurs,
- Un effet délétère du PBS sur la motilité individuelle ou la viabilité (et donc la motilité) des spermatozoïdes,

- Un effet bénéfique de l'Optidyl® sur la motilité individuelle des spermatozoïdes, hypothèse que l'on rejette puisqu'il semble peu probable qu'un dilueur puisse augmenter la proportion de spermatozoïdes fléchants dans l'éjaculat.

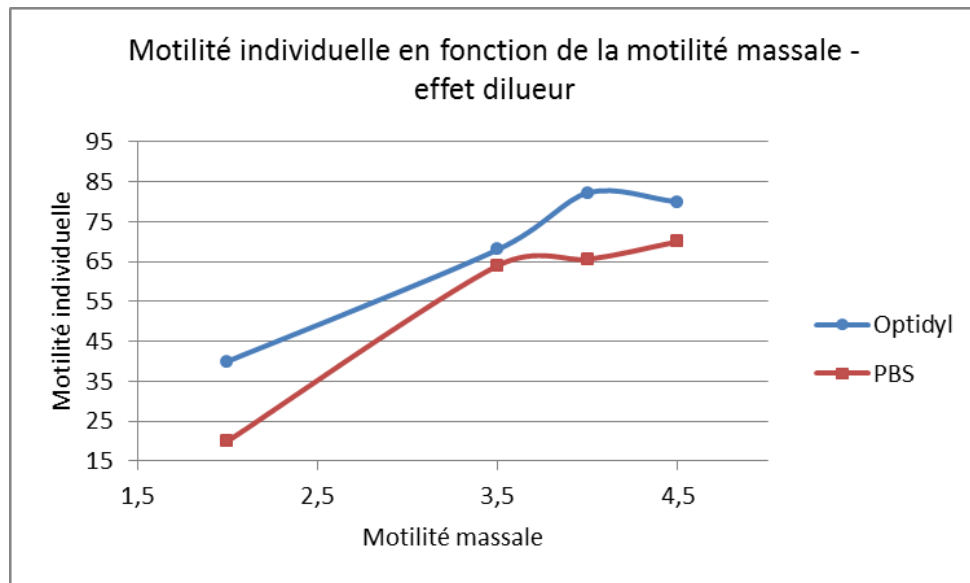


Figure 5 : Motilité individuelle en fonction de la motilité massale - effet dilueur.

3.3.5.2. Motilité individuelle

La Figure 6 présente les moyennes des pourcentages de spermatozoïdes morts en fonction de la motilité individuelle. On peut voir :

- Avec le PBS :
 - o La coloration au KVE surestime de beaucoup le pourcentage de spermatozoïdes morts par rapport à une coloration au VitalStain de manière significative sauf pour une motilité individuelle de 2,5 (même tendance mais écart-types qui se recoupent).
- Avec l'Optidyl® :
 - o La coloration au KVE surestime de peu le pourcentage de spermatozoïdes morts par rapport à une coloration au VitalStain de manière significative sauf pour une motilité individuelle de 3 et 3,5 (même tendance mais écart-types qui se recoupent).
- Pour une motilité individuelle donnée, une dilution au PBS semble donner des pourcentages de spermatozoïdes morts supérieurs à une dilution à l'Optidyl® d'autant plus qu'on a émis l'hypothèse (paragraphe 3.3.5.1) qu'une dilution au PBS induit une dépréciation de la motilité individuelle de l'éjaculat (par altération de la motilité des spermatozoïdes ou de la viabilité) ce qui signifie que pour avoir une motilité individuelle de départ identique, il faut que la qualité de l'éjaculat initial dilué au PBS

soit meilleure que la qualité de l'éjaculat initial dilué à l'Optidyl®. Ce qui confirme qu'il semblerait y avoir un effet délétère du PBS sur la viabilité (avec ou non effet sur la motilité) par rapport à l'Optidyl®.

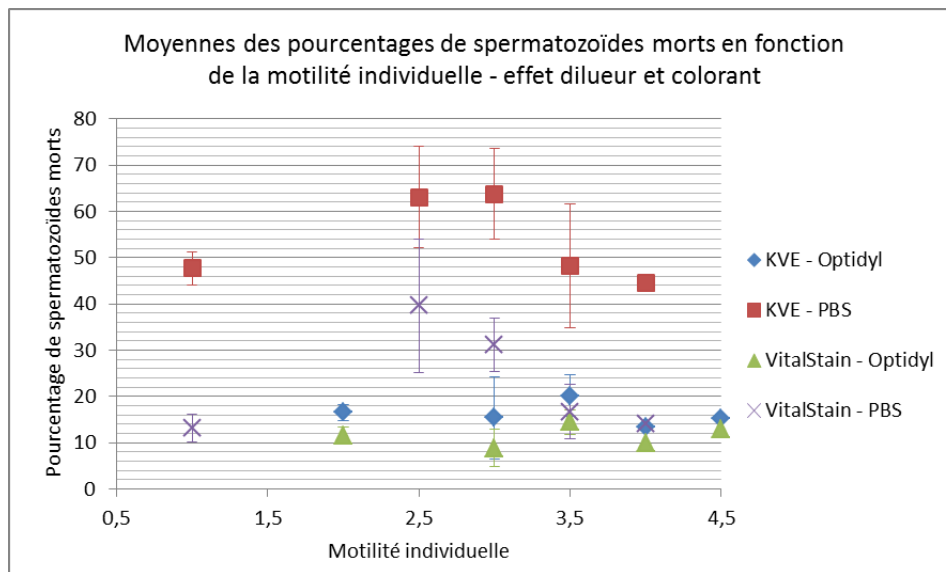


Figure 6 : Moyennes des pourcentages de spermatozoïdes morts en fonction de la motilité individuelle - effet dilueur et colorant.

Il existe une proportion de spermatozoïdes dans l'éjaculat qui sont vivants mais non comptabilisés dans la lecture de la motilité individuelle (immobiles, ou non fléchants). Il n'est donc pas possible d'estimer précisément le pourcentage de spermatozoïdes morts par les résultats de motilité individuelle. Cependant, si l'on somme les pourcentages de spermatozoïdes colorés (et donc morts) avec les pourcentages de spermatozoïdes fléchants (qui sont vivants), il n'est pas possible d'avoir un pourcentage supérieur à 100% à moins qu'il n'y ait une surestimation du pourcentage de spermatozoïdes morts supérieure au pourcentage de spermatozoïdes vivants non fléchants par la lecture de lame après coloration.

Le Tableau 12 nous montre :

- Qu'en diluant avec l'Optidyl®, les pourcentages de spermatozoïdes colorés n'excèdent pas 40% alors qu'ils peuvent atteindre jusqu'à 90% avec le PBS.
- Le couple PBS-KVE possède des valeurs systématiquement supérieures à 100%, et donc surestime systématiquement le pourcentage de spermatozoïdes morts par rapport à la réalité.
- Le couple Optidyl®-VitalStain possède des valeurs systématiquement inférieures à 100%, ce qui signifie que s'il surestime le pourcentage de morts, c'est de peu (valeur inférieure au pourcentage de spermatozoïdes vivants non fléchants).
- Les couples Optidyl®-KVE et PBS-VitalStain possèdent des valeurs dispersées mais avec une majorité des valeurs inférieures à 100% :
 - o Optidyl® – KVE : Médiane du pourcentage de spermatozoïdes morts = 14,25%, et seulement 5 valeurs (/62) se situent dans la catégorie 31-40% de spermatozoïdes colorés,
 - o PBS – VitalStain : Médiane du pourcentage de spermatozoïdes morts = 17,25%, avec 5 valeurs (/62) dans les catégories > 51% de spermatozoïdes morts et 12 valeurs (/62) dans les catégories > 41% de spermatozoïdes morts.

Tableau 12 : Somme du pourcentage de spermatozoïdes colorés et du pourcentage de spermatozoïdes motiles en fonction du pourcentage de spermatozoïdes colorés (résultats en moyenne \pm écart-type).

Pourcentages de spermatozoïdes colorés	Optidyl® - KVE	Optidyl® - VitalStain	PBS - KVE	PBS - VitalStain
0-10	87,25 \pm 1,65	82,21 \pm 11,29		75,79 \pm 20,93
11-20	87,88 \pm 13,22	89,47 \pm 12,61		75,65 \pm 16,38
21-30	95,28 \pm 14,47	95,17 \pm 5,35	107 \pm 3,54	93,71 \pm 4,69
31-40	112 \pm 5,61		106,92 \pm 10,03	93,5 \pm 1,41
41-50			108,24 \pm 17,58	105,33 \pm 2,88
51-60			109,13 \pm 16,67	111 \pm 0,71
61-70			132,54 \pm 6,8	114,5 \pm 1,73
71-80			132,38 \pm 5,71	121 \pm 0
81-90			134,75 \pm 3,18	

3.3.6. Conclusion partielle : pourcentage de spermatozoïdes morts

Même si l'interaction Taur*Ejac n'a pas d'effet significatif sur le pourcentage de spermatozoïdes morts à la lecture de lame (étude des moyennes et écart-types, résultats non montrés), les variations restent cependant très importantes (Ex : pour le taureau 1, le 27/01/15, moyenne \pm écart-type = 18,9 \pm 13,9, le 03/02/15, moyenne \pm écart-type = 35,3 \pm 23,9) ce qui signifie qu'il ne faut pas conclure trop rapidement, mais qu'il faut répéter les mesures pour décider si un taureau n'est pas satisfaisant.

Il existe une interaction entre dilueur et colorant sur le pourcentage de spermatozoïdes morts, avec le couple PBS/KVE (moyenne \pm écart-type = 54,5 \pm 14,1) qui donne des pourcentages significativement plus élevés que les autres couples (moyennes \pm écart-type entre 11,5 \pm 4,3 et 23,5 \pm 16,0).

Nous avons mis en évidence l'effet délétère du PBS par rapport à l'Optidyl® sur la motilité individuelle. De même, nous avons montré que pour chaque dilution prise séparément, une coloration au KVE donne des pourcentages de spermatozoïdes morts supérieurs à une coloration au VitalStain. Par la mise en relation des pourcentages de spermatozoïdes morts et de la somme des spermatozoïdes morts et des spermatozoïdes fléchants, il semblerait que :

- le couple PBS-KVE surestime par rapport à la réalité le pourcentage de spermatozoïdes morts,
- le couple Optidyl®-VitalStain ne surestime pas (ou de peu) par rapport à la réalité le pourcentage de spermatozoïdes morts,
- les couples Optidyl®-KVE et PBS-VitalStain surestiment par rapport à la réalité le pourcentage de spermatozoïdes morts lorsque celui-ci est élevé (respectivement >31% et >41%).

Pour chaque dilueur pris séparément, le taux de dilution n'a pas d'effet significatif (écart-

types qui se recoupent) sur le pourcentage de spermatozoïdes morts même s'il semble qu'une dilution entre 1:5 et 1:10 donne des pourcentages plus élevés.

Nous n'avons pas observé de relation entre « lecteur » et pourcentage de spermatozoïdes morts après coloration.

3.4. Etude du pourcentage d'anomalies morphologiques

Les graphiques proviennent de la lecture de 2 lames par lecteur, par couple dilueur/colorant, par taureau et par éjaculat, soit $n = 256$.

3.4.1. Variables exploitées

Nous incluons dans l'étude uniquement les anomalies morphologiques dont le pourcentage est supérieur ou égal à 0,5% soit : GP, TA, QE, PI, Amaj, GD, TD, QR, Amin, Atot.

3.4.2. Résultats bruts

Les résultats de l'analyse de variance du modèle présenté page 18 sont regroupés dans le Tableau 13.

Tableau 13 : Résultats de l'ANOVA relative aux anomalies morphologiques

	GP	TA	QE	PI	Amaj	GD	TD	QR	Amin	Atot
Taur	***	***	***	***	***	***	***	NS	**	***
Ejac	***	NS	NS	***	**	NS	NS	NS	*	***
Dil	NS	NS	NS	*	NS	***	NS	***	***	***
Col	***	NS	***	***	NS	***	NS	***	***	***
LectL	***	***	*	***	***	***	NS	***	**	***
QdilmLq	NS	**	**	NS	***	***	**	NS	***	***
Taur*Ejac	NS	**	NS	**	***	NS	NS	*	*	*
Dil*Col	**	NS	**	NS	***	**	*	***	***	***
Dil*QdilmLq	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
LectL*Dil	NS	NS	NS	NS	*	NS	NS	NS	NS	NS
LectL*Col	NS	NS	***	***	NS	*	NS	***	NS	NS
Dil*Col*LectL	NS	NS	**	NS	***	NS	NS	NS	NS	NS

*** $p=0$, ** $p=0.001$, * $p=0.01$, NS = non significatif ; GP = gouttelette cytoplasmique proximale, TA = tête pyriforme ou amincie à la base ou avec crêtes nucléaires ou repliée, QE = queue enroulée autour de la tête, PI = déformation de la pièce intermédiaire, Amaj = anomalies majeures, GD = gouttelette cytoplasmique distale, TD = tête normale sans queue, QR = queue repliée ou enroulée à l'extrémité, Amin = anomalies mineures, TotA = anomalies morphologiques ; Taur = taureau, Ejac = éjaculat, Dil = dilueur, Col = colorant, LectL = lecteur de lame, QdilmLq = quantité de dilueur ajouté par mL d'éjaculat.

Pour les anomalies morphologiques individuelles, on observe que :

- Il existe un effet taureau significatif pour chaque anomalie morphologique, excepté pour les queues repliées ou enroulées à l'extrémité (QR), sur lequel les effets du dilueur, du colorant et du lecteur de lame sont significatifs.
- Il existe un effet lecteur de lame significatif pour chaque anomalie morphologique, excepté pour les têtes normales sans queue (TD).
- Il semble y avoir une interaction significative entre dilueur et colorant pour chaque anomalie morphologique excepté pour les têtes pyriformes ou amincies à la base ou avec crête nucléaires ou repliées (TA) et pour les déformations de la pièce intermédiaire (PI).
- L'interaction entre dilueur et quantité de dilueur ajouté par mL d'éjaculat pur n'a pas d'effet significatif sur le pourcentage de n'importe quelle anomalie morphologique.

3.4.3. Pourcentage d'anomalies majeures

3.4.3.1. Effet de l'interaction entre dilueur et colorant

Les résultats de l'ANOVA montrent que l'interaction du colorant et du dilueur semble significative ($p < 0,001$) sur le pourcentage d'anomalies majeures, cependant, nous n'avons pas mis en évidence de différences significatives avec les résultats de l'étude (Tableau 14).

Tableau 14 : Pourcentages d'anomalies majeures en fonction du dilueur et du colorant (résultats en moyenne \pm écart-type, $n=64$ pour chaque case Dil*Col).

	KVE	VitalStain
Optidyl®	7 \pm 5,7	5,2 \pm 3
PBS	4,9 \pm 3,1	7,8 \pm 5,3

3.4.3.2. Effet de l'interaction entre dilueur, colorant et lecteur

Les résultats de l'ANOVA montrent que l'interaction du lecteur de lame, du colorant et du dilueur semble significative ($p < 0,001$), ce qu'infirmes le Tableau 15 avec des pourcentages d'anomalies majeures qui ne diffèrent pas significativement entre les groupes. On observe que le lecteur de lame n'a pas d'effet significatif sur le pourcentage d'anomalies majeures (colonne « Total ») même si les moyennes entre lecteurs diffèrent d'environ 2%. De même l'interaction lecteur de lame et dilueur n'est pas significative (colonnes « Total Optidyl® » et « Total PBS »).

Tableau 15 : Pourcentages d'anomalies majeures en fonction du dilueur, du colorant et du lecteur de lame (résultats en moyenne \pm écart-type, $n=36$ pour chaque case Dil*Col*LectL).

	Optidyl® - KVE	Optidyl® - VitalStain	Total Optidyl®	PBS - KVE	PBS - VitalStain	Total PBS	Total
Lecteur 1	9,5 \pm 6,8	5,9 \pm 3,7	7,7 \pm 5,7	5,3 \pm 4,0	9,2 \pm 6,8	7,2 \pm 5,9	7,5 \pm 5,8
Lecteur 2	4,5 \pm 2,4	4,5 \pm 2,0	4,5 \pm 2,2	4,4 \pm 1,5	6,4 \pm 2,8	5,4 \pm 2,4	4,9 \pm 2,4

3.4.3.3. Effet de la quantité de dilueur ajouté par mL d'éjaculat pur

Malgré une interaction significative de la quantité de dilueur ajouté par mL d'éjaculat pur sur le pourcentage d'anomalies majeures au vu de l'ANOVA ($p < 0,001$), nos résultats (Tableau 16) montrent le contraire (écart-types qui se recourent). Cependant, il est intéressant de noter que même si ce n'est pas significatif, il y a presque deux fois plus d'anomalies majeures lorsque 1 mL d'éjaculat pur est dilué avec moins de 5 mL de dilueur en comparaison avec les autres dilutions, or, cette catégorie de dilution ne contient que le 4^{ième} éjaculat du taureau 4.

Tableau 16 : Pourcentages d'anomalies majeures en fonction de la quantité de dilueur ajouté par mL d'éjaculat (résultats en moyenne \pm écart-type).

Quantité de dilueur ajouté par mL d'éjaculat	<5mL	[5-10[mL	[10-15[mL	[15-20[mL	>20mL
Pourcentage d'anomalies majeures	12,2 \pm 9,4	5,3 \pm 2,8	5,7 \pm 2,5	6,1 \pm 4,1	5,4 \pm 4,9

3.4.3.4. Effet de l'interaction entre taureau et éjaculat

Malgré un effet significatif du taureau, de l'éjaculat, et de leur interaction sur le pourcentage d'anomalies majeures au vu de l'ANOVA ($p = 0,001$), nos résultats (Tableau 17) ne permettent pas de conclure (écart-types qui se recourent). Cependant, on observe que :

- Le pourcentage d'anomalies majeures est plus élevé pour le 4^{ième} éjaculat du taureau 4 comparé aux autres taureaux et aux autres éjaculats, conformément à ce qui a été dit dans le paragraphe précédent,
- Si l'on considère les anomalies majeures individuellement (résultats non montrés) :
 - o Le pourcentage de PI est plus élevé pour le 4^{ième} éjaculat du taureau 4 en comparaison avec tous les autres éjaculats (moyenne \pm écart-type = 6,34 \pm 8,91, moyenne générale = 1,44 \pm 2,89),
 - o Ce n'est pas le cas des autres anomalies majeures (GP, TA, QE, FD, CR, AB).

Tableau 17 : Pourcentages d'anomalies majeures en fonction du taureau et de l'éjaculat (résultats en moyenne \pm écart-type, $n = 16$ pour chaque case Taur*Ejac).

	Taur 1	Taur 2	Taur 3	Taur 4
Ejac 1	7,0 \pm 8,9	4,5 \pm 1,9	6,3 \pm 2,3	8,7 \pm 3,2
Ejac 2	5,8 \pm 4,7	5,7 \pm 1,0	7,7 \pm 2,7	5,8 \pm 3,2
Ejac 3	5,0 \pm 5,2	5,6 \pm 1,9	6,0 \pm 3,2	3,8 \pm 1,8
Ejac 4	3,8 \pm 1,6	4,7 \pm 2,3	6,8 \pm 2,8	12,2 \pm 9,4

3.4.3.5. Conclusion partielle : pourcentage d'anomalies majeures

Même si l'éjaculat n'a pas d'effet significatif sur le pourcentage d'anomalies majeures à la lecture de lame, les variations restent cependant très importantes (Ex : pour le taureau 1, lors du premier éjaculat, moyenne \pm écart-type = 7,0 \pm 8,9, lors du 4^{ième} éjaculat, moyenne \pm écart-

type = $3,8 \pm 1,6$) ce qui signifie qu'il ne faut pas conclure trop rapidement, mais qu'il faut répéter les mesures pour décider si un taureau n'est pas satisfaisant.

Nous n'avons pas mis en évidence d'effet du dilueur, du colorant ou de leur interaction sur le pourcentage d'anomalies majeures.

Le taux de dilution ne semble pas avoir d'effet sur le pourcentage d'anomalies majeures (écart-types qui se recourent), cependant la catégorie 1 de dilution possède un pourcentage moyen supérieur aux autres catégories (non significatif). Cette catégorie ne contient que l'éjaculat 4 du taureau 4, son pourcentage élevé d'anomalies majeures par rapport aux autres éjaculat s'explique par un pourcentage plus élevé de déformations de la pièce intermédiaire (PI) de ce même éjaculat par rapport aux autres (non significatif).

Nous n'avons pas observé de relation entre lecteur et pourcentage d'anomalies majeures à la lecture de lame.

3.4.4. Pourcentage d'anomalies mineures

3.4.4.1. Réflexion

Les pourcentages de queues repliées ou enroulées à l'extrémité (QR) (moyenne \pm écart-type = $19,1 \pm 21,9$) représentent environ 86% du pourcentage d'anomalies mineures (moyenne \pm écart-type = $22,3 \pm 21,3$). Les pourcentages d'anomalies mineures (moyenne \pm écart-type = $3,2 \pm 2,5$) seront analysés par la suite sans comptabiliser les pourcentages de QR (variable « Amin sans QR ») de manière à ne pas noyer les pourcentages des autres anomalies mineures dans ceux des QR.

Tableau 18 : Résultats de l'ANOVA relative aux pourcentages de queues repliées ou enroulées à l'extrémité (QR) et aux anomalies mineures sans QR (Amin sans QR).

	QR	Amin sans QR
Taur	NS	***
Ejac	NS	*
Dil	***	***
Col	***	***
LectL	***	NS
QdilmLq	NS	***
Taur*Ejac	*	NS
Dil*Col	***	NS
Dil*QdilmLq	NS	*
LectL*Dil	NS	NS
LectL*Col	***	NS
Dil*Col*LectL	NS	NS

*** $p=0$, ** $p=0.001$, * $p=0.01$, NS = non significatif

3.4.4.2. Résultats de l'ANOVA

Le pourcentage d'anomalies mineures sans QR est analysé à l'aide d'une analyse de variance selon le modèle présenté page 18, les résultats sont donnés dans le Tableau 18 ci-dessous, auxquels sont ajoutés ceux concernant les pourcentages de QR issus du Tableau 13 :

On observe que :

- Les seuls effets significatifs sur Amin sans QR sont la quantité de dilueur ajouté par mL d'éjaculat pur, le dilueur, le colorant, et le taureau.

- Beaucoup de variables ont un effet significatif sur QR, cependant on remarque que ni le taureau ni l'éjaculat n'a d'effet significatif, et malgré

le fait que l'interaction Taur*Ejac soit significative ($p=0,01$), nos résultats ne mettent pas en évidence de différences (moyennes proches et écart-types qui se recoupent, résultats non montrés). Ainsi, il semblerait que si les pourcentages de QR varient, ce soit lié uniquement à la méthode (coloration, dilution, lecture).

3.4.4.3. Pourcentage de queues repliées ou enroulées à l'extrémité (QR)

3.4.4.3.1. Effet de l'interaction entre dilueur et colorant

Il existe une interaction significative du dilueur et du colorant sur le pourcentage de QR ($p<0,001$), avec un pourcentage plus élevé (moyenne \pm écart-type = $36,8 \pm 17,9$) lorsque la semence est colorée avec du KVE plutôt qu'avec du VitalStain (moyenne \pm écart-type = $1,3 \pm 1,3$) (ligne « total » du Tableau 19). Ce pourcentage d'anomalies morphologiques coloré avec le KVE est d'autant plus élevé s'il est dilué avec de l'Optidyl® (moyenne \pm écart-type = $49,4 \pm 14$) plutôt qu'avec du PBS (moyenne \pm écart-type = $24,3 \pm 11,6$), mais de manière non significative (écart-types qui se recoupent).

Tableau 19 : Pourcentages de queues repliées ou enroulées à l'extrémité (QR) en fonction du dilueur et du colorant (résultats en moyenne \pm écart-type, $n=64$ pour chaque case Dil*Col).

	KVE	VitalStain
Optidyl®	$49,4 \pm 14^A$	$1,3 \pm 1,2^B$
PBS	$24,3 \pm 11,6^A$	$1,4 \pm 1,3^B$
Total	$36,8 \pm 17,9$	$1,3 \pm 1,3$

En colonnes : des lettres capitales différentes montrent des moyennes significativement différentes.

3.4.4.3.2. Effet de l'interaction entre lecteur et colorant

Le Tableau 20 montre comme précédemment l'effet significatif du colorant sur le pourcentage de QR. Cependant, aucun effet du lecteur (colonne « Total ») ni de l'interaction du lecteur et du colorant n'est mis en évidence, même si il semblerait qu'en moyenne, le lecteur 2 compte deux fois moins de QR que le lecteur 1 lorsque les lames sont colorées avec le VitalStain (résultat non significatif).

Tableau 20 : Pourcentages de queues repliées ou enroulées à l'extrémité (QR) en fonction du colorant et du lecteur de lame (résultats en moyenne \pm écart-type, $n=64$ pour chaque case LectL*Col).

	KVE	VitalStain	Total
Lecteur 1	$38,1 \pm 18,7$	$2 \pm 1,3$	$20,1 \pm 22,4$
Lecteur 2	$35,6 \pm 17,2$	$0,6 \pm 0,6$	$18,1 \pm 21,3$

3.4.4.4. Pourcentage d'anomalies mineures sans queues repliées ou enroulées à l'extrémité (Amin sans QR)

3.4.4.4.1. Effet de l'interaction entre dilueur et colorant

Le Tableau 21 ne met en évidence aucune interaction significative du dilueur et du colorant sur le pourcentage d'anomalies mineures sans QR, ce qui confirme les résultats de l'ANOVA (page 33). De même, il n'y a pas d'effet significatif du colorant (ligne « Total »), ni du dilueur (résultats non montrés).

Tableau 21 : Pourcentages d'anomalies mineures sans queues repliées ou enroulées à l'extrémité (Amin sans QR) en fonction du dilueur et du colorant (résultats en moyenne \pm écart-type, n=64 pour chaque case Dil*Col).

	KVE	VitalStain
Optidyl®	2,3 \pm 1,6	3,3 \pm 2,2
PBS	2,8 \pm 2,1	4,5 \pm 3,1
Total	2,5 \pm 1,9	3,9 \pm 2,7

3.4.4.4.2. Effet de la quantité de dilueur ajouté par mL d'éjaculat pur

La quantité de dilueur ajouté par mL d'éjaculat pur a un effet significatif ($p < 0,001$) sur le pourcentage d'anomalies mineures sans QR (ANOVA page 33), cependant, même si les pourcentages sont plus élevés pour la catégorie 1 comparés aux autres catégories, les écart-types se recourent (Tableau 22).

Tableau 22 : Pourcentage d'anomalies mineures sans queues repliées ou enroulées à l'extrémité (Amin sans QR) en fonction de la quantité de dilueur ajouté par mL d'éjaculat pur (résultats en moyenne \pm écart-type).

Catégorie	Quantité de dilueur ajouté en mL par mL d'éjaculat pur	Effectif des catégories	Amin sans QR
1	<5mL	1xT4	7,6 \pm 5,2
2	[5-10[mL	1xT4, 1xT2	2,8 \pm 1,3
3	[10-15[mL	1xT2, 1xT3, 1xT4	2,9 \pm 1,3
4	[15-20[mL	2xT1, 2xT2, 3xT3, 1xT4	3,2 \pm 2,1
5	>20mL	2xT1	1,9 \pm 1,2

3.4.4.4.3. Effet taureau et éjaculat

L'analyse de variance (page 33) montre que l'interaction entre taureau et éjaculat n'est pas significative sur le pourcentage d'anomalies mineures sans QR ($p > 0,01$). Cependant nos résultats montrent (Tableau 23) que l'éjaculat 1 du taureau 4 possède des pourcentages d'anomalies mineures sans QR significativement supérieures aux 3 derniers éjaculats du taureau 1 (résultat non pertinent). De même, le taureau 4, et plus particulièrement lors du 4^{ième} éjaculat, et dans une moindre mesure le taureau 2, possèdent des pourcentages d'anomalies mineures sans QR supérieurs aux autres taureaux, mais de manière non significative (ligne « Total »).

Tableau 23 : Pourcentage d'anomalies mineures sans QR en fonction du taureau (Taur) et du numéro d'éjaculat (Ejac), (résultats en moyenne \pm écart-type, n=16 pour chaque case Taur*Ejac).

	Taur 1	Taur 2	Taur 3	Taur 4
Ejac 1	2,3 \pm 2	3,8 \pm 2,2	3,2 \pm 1,5	5,7 \pm 2,3 ^A

Ejac 2	$2 \pm 1,1^B$	$3,5 \pm 1,3$	$2,4 \pm 0,9^B$	$3,1 \pm 1,3$
Ejac 3	$1,8 \pm 1,2^B$	$3,7 \pm 1,8$	$2,8 \pm 2,1$	$2,8 \pm 1,6$
Ejac 4	$1,7 \pm 1,1^B$	$2,6 \pm 1,4$	$2,2 \pm 1,4$	$7,6 \pm 5,2$
Total	$2 \pm 1,4$	$3,4 \pm 1,7$	$2,6 \pm 1,5$	$4,8 \pm 3,6$

En exposant, des lettres capitales différentes montrent des moyennes significativement différentes.

Ainsi, si l'on s'intéresse à chaque anomalie mineure excepté QR, on remarque :

- Qu'il existe un effet taureau (non significatif) sur le pourcentage de TD, avec les taureaux 2 et 4 qui possèdent des pourcentages supérieurs aux taureaux 1 et 3 (respectivement, moyenne \pm écart-type = $1,82 \pm 1,18$; $2,36 \pm 1,64$ et moyenne \pm écart-type = $0,85 \pm 0,68$; $0,98 \pm 0,85$).
- Qu'il existe un effet Taur*Ejac (non significatif) sur le pourcentage de GD, avec l'éjaculat 4 du taureau 4 qui possède des valeurs supérieures aux autres éjaculats et aux autres taureaux (moyenne \pm écart-type = $4,56 \pm 5,35$; moyenne générale \pm écart-type = $0,76 \pm 1,8$).
- Que le taureau, l'éjaculat, et leur interaction n'a pas d'effet significatif sur le pourcentage de TE, IA, AA, RP, et Autre.

3.4.4.5. Conclusion partielle : pourcentage de QR et d'anomalies mineures sans QR

Il existe un effet très significatif du colorant sur le pourcentage de QR avec un pourcentage plus élevé lorsque la coloration est réalisée à l'aide du KVE (moyenne \pm écart-type = $36,8 \pm 17,9$) plutôt qu'avec du VitalStain (moyenne \pm écart-type = $1,3 \pm 1,3$). Le dilueur n'a pas d'effet significatif puisque les écart-types se recoupent, cependant les moyennes sont assez différentes (KVE-Optidyl® : moyenne \pm écart-type = $49,4 \pm 14$; KVE-PBS : moyenne \pm écart-type = $24,3 \pm 11,6$). Ainsi, il semblerait que les pourcentages de QR élevés que l'on retrouve dans nos résultats soient artéfactuels.

Les seuls effets significatifs sur le pourcentage d'anomalies mineures sans QR sont le taureau et l'éjaculat qui correspondent à la variabilité inter-individuelle (taureau 2 et taureau 4 qui ont des pourcentages plus élevés d'anomalies mineures sans QR, dont l'origine est probablement liée à leur pourcentages plus élevés de TD), et intra-individuelle (éjaculat 4 du taureau 4 qui possède un pourcentage d'anomalies mineures sans QR plus élevé que les autres éjaculats, dont l'origine est probablement liée à son pourcentage plus élevé de GD).

Le taux de dilution ne semble pas avoir d'effet sur le pourcentage d'anomalies mineures sans QR, cependant la catégorie 1 de dilution qui ne contient que l'éjaculat 4 du taureau 4 possède un pourcentage moyen supérieur aux autres catégories (non significatif).

Nous n'avons pas observé d'effet du lecteur de lame sur le pourcentage de QR et le pourcentage d'anomalies mineures sans QR (résultats non montrés).

4. Discussion

4.1. Matériels et méthodes

La finalité de cette étude est de mettre en évidence l'effet du dilueur, du colorant et de leur interaction sur le pourcentage de spermatozoïdes morts et sur le pourcentage d'anomalies morphologiques. L'objectif a donc été, lors de l'élaboration du protocole de limiter autant que possible la variabilité aléatoire. Pour cela :

- Le choix a été fait de multiplier les éjaculats sur un nombre de taureaux limité (4) plutôt que d'inclure plus de taureaux mais avec moins de répétitions. Ainsi, même si la population étudiée est petite, nous avons plusieurs mesures (2 lames, 2 lecteurs, 2 dilueurs, 2 colorants, 4 éjaculats) pour chaque variable, avec un nombre de spermatozoïdes lus à 200 par lame.
- Les taureaux inclus dans l'étude appartiennent au même centre de production de semence, ce qui a l'avantage :
 - o de limiter la variabilité liée à l'hébergement, l'alimentation,
 - o de pouvoir prélever tous les taureaux au même moment (même matinée), et donc avec le même intervalle de collection pour tous les taureaux,
 - o de prélever la semence de manière invariable dans le temps grâce à des opérateurs expérimentés, du matériel adapté, et une méthodologie standardisée,
 - o d'obtenir de la semence que l'on sait être de bonne qualité ce qui limite la variabilité inter-individuelle (Gérard et al., 2008).

Malgré cet effort pour limiter la variabilité, certains points sont améliorables, notamment le taux de dilution, puisque l'on voit que, lors du premier éjaculat, les dilutions ne tiennent pas compte de la concentration de l'éjaculat, et pour les éjaculats suivant, la quantité de dilueur ajouté par mL d'éjaculat pur diffère entre les taureaux et entre les éjaculats. Nous avons alors introduit le taux de dilution comme variable explicative du pourcentage de spermatozoïdes morts et le pourcentage d'anomalies morphologiques de manière à en quantifier l'effet. Cependant, il existe un biais lié à la construction de cette variable puisque chaque éjaculat n'a été soumis qu'à une seule dilution, et donc lorsqu'on compare les taux de dilution, on confronte des résultats qui proviennent d'éjaculats différents. De plus, les taureaux qui possèdent un éjaculat post-décongélation riche (qui dépend donc de la concentration initiale, du pourcentage de spermatozoïdes vivants avant la congélation et de l'aptitude des spermatozoïdes à la congélation/décongélation) seront plus dilués que les autres, ainsi on retrouve dans les catégories 4 et 5 uniquement (dilutions $> 1 : 20$) les très bons éjaculats, et dans la catégorie 1 (dilution $< 1 : 5$) uniquement l'éjaculat 4 du taureau 4 de qualité très moyenne.

Au départ, 3 dilueurs devaient être inclus dans l'étude. Le premier était celui utilisé lors des manipulations qui ont abouti aux résultats discordants entre motilité massale ou individuelle et pourcentage de morts (Esteban-Gil et al., 2014) ; il n'a finalement pas été retenu compte

tenu des mauvais résultats lors de cette manipulation et lors de son utilisation pour la congélation de la semence (Beran et al., 2012). Nous avons donc choisi d'inclure uniquement des dilueurs disponibles sur le marché Français et dont la qualité est théoriquement bonne ou du moins pas décrite comme mauvaise. C'était le cas du dilueur utilisé à Midatest : l'Optidyl®. Nous avons décidé d'inclure un dilueur très simple, non destiné à la cryoconservation de la semence, mais avec un pH et une osmolarité compatible avec les cultures de cellules de mammifères : le PBS.

De même, les colorants sont choisis avec pour objectif de pouvoir être utilisés sur le terrain par des praticiens vétérinaires et doivent donc répondre à plusieurs critères : facilité et rapidité d'utilisation, disponibilité, et faible coût. C'est le cas de la coloration à base d'éosine-nigrosine qui a l'avantage de permettre la lecture simultanée du pourcentage de spermatozoïdes morts et du pourcentage d'anomalies morphologiques. Il existe de nombreux colorants à base d'éosine-nigrosine sur le marché, nous avons décidé d'inclure seulement deux kits commerciaux qui diffèrent par leur méthode : une coloration en une étape avec éosine et nigrosine dans le même réactif (Sperm VitalStain®) et une coloration en deux étapes avec éosine et nigrosine séparées (Kit Vita Eosine®).

4.2. Pourcentage de spermatozoïdes morts

Nous avons observé un effet significatif de l'interaction entre le dilueur et le colorant ($p < 0,001$) sur le pourcentage de spermatozoïdes morts, avec le couple PBS/KVE donnant des pourcentages supérieurs à ceux des autres couples et surestimés par rapport à la réalité.

Une équipe suédoise d'andrologie (Björndahl et al., 2004) a comparé les résultats de la littérature sur la viabilité des spermatozoïdes soumis à des techniques de coloration à l'éosine-nigrosine qui diffèrent par le mode opératoire (une étape vs deux étapes), la concentration en éosine et la durée d'exposition des spermatozoïdes à l'éosine. Il apparaît que plusieurs facteurs affectent la viabilité des spermatozoïdes, dont l'exposition des spermatozoïdes à l'éosine, elle-même dépendante de sa concentration, sa concentration libre et son temps d'exposition, puisqu'il semblerait que l'éosine Y soit toxique à des concentrations supérieures à 7g/L ((Eliasson, Treichl, 1971) cité par (Björndahl et al., 2004)). De même, des conditions hypo-osmotiques entraînent une augmentation du nombre de spermatozoïdes morts (Björndahl et al., 2004 ; Liu, Foote, 1998). En effet, la viabilité diminue en condition hypo-osmotique et hyper-osmotique avec cependant aucune différence significative de viabilité entre 200 et 300 mOsm (Liu, Foote, 1998).

L'Optidyl® diffère du PBS par le fait qu'il contient, entre autres, 20% (p/v) de jaune d'œuf, et possède une osmolarité supérieure (1372 mOsm/kg (Amirat et al., 2004), PBS : 270 à 300 mOsm/kg (ThermoFisherScientific, 2015)). Il est utilisé en diluant 500 mL dans 1L d'eau distillée, et possède donc une osmolarité finale de 457mOsm/kg. Après dilution des éjaculats, et en supposant que les éjaculats possèdent une osmolarité d'environ 300 mOsm/kg (Rossato

et al., 2002), l'osmolarité moyenne des aliquotes diluées avec le PBS est de 272 ± 2 mOsm/kg, tandis que celle des aliquotes diluées avec l'Optidyl® est de 445 ± 8 mOsm/kg. L'osmolarité des colorants utilisés étant inconnue, il est impossible de connaître l'osmolarité finale des préparations. Cependant on peut considérer que pour chaque colorant, l'osmolarité finale d'un éjaculat dilué avec le PBS sera inférieure à l'osmolarité finale du même éjaculat dilué avec l'Optidyl®. Avec une coloration au KVE, une goutte de mélange sperme + dilueur est mélangée avec 3 autres gouttes de colorant, tandis que pour une coloration au SpermVitalstain, une goutte de mélange sperme + dilueur est mélangée avec une seule goutte de colorant, ce qui signifie que l'osmolarité du KVE aura plus d'effet que celle du VitalStain sur l'osmolarité finale. De plus, il a été décrit (Barth, 2006) que les formulations d'éosine-nigrosine communément utilisées possèdent une osmolarité entre 90 et 100 mOsm/kg. Et donc, si l'on fait l'hypothèse que les colorants sont légèrement hypo-osmolaires, le mélange final colorant + dilueur + semence du couple KVE-PBS sera le plus hypo-osmolaire de tous. Pour plus de clarté, ces résultats sont synthétisés dans le Tableau 24.

Tableau 24 : Osmolarité et variations d'osmolarité des aliquotes lors de la coloration (en mOsm/kg).

		KVE			VitalStain	
		Départ	Etape intermédiaire	Final	Départ	Final
PBS	Osmolarité	272	186	143	272	186
	Variation d'osmolarité	$\Delta = 86$		$\Delta = 43$	$\Delta = 86$	
Optidyl®	Osmolarité	445	272	186	445	272
	Variation d'osmolarité	$\Delta = 173$		$\Delta = 86$	$\Delta = 173$	

Les valeurs sont obtenues en faisant l'hypothèse que les colorants possèdent une osmolarité égale à 100 mOsm/kg.

Pour l'élaboration de son produit SpermVitalstain, Nidacon cite la référence (Björndahl et al., 2004), dans laquelle une technique de coloration à l'éosine-nigrosine en une étape de même protocole que le SpermVitalstain est mise en avant pour sa facilité d'utilisation et ses résultats plus satisfaisants que les autres. Le colorant en question est un mélange d'éosine à 6,7g/L, de nigrosine à 100g/L, de NaCl à 0,9g/L à mélanger en quantité égale à de la semence diluée, soit une concentration du mélange en éosine à 3,3 g/L et en nigrosine à 50g/L pendant 30 secondes. La notice d'utilisation du KVE datant de juillet 2000 donne des concentrations éosine et en nigrosine de 20g/L, ce qui signifie que les spermatozoïdes sont soumis à 10g/L d'éosine pendant 30 secondes puis à une concentration à 5g/L d'éosine et à 10g/L de nigrosine le temps de faire l'étalement. Si les concentrations en éosine des colorants utilisés sont celles que l'on suppose, une coloration au KVE expose les spermatozoïdes à une concentration en éosine 3 fois supérieure à celle du SpermVitalstain. La concentration libre en éosine, c'est-à-dire la concentration en éosine à laquelle les spermatozoïdes sont soumis dépend à la fois de la concentration en éosine mais aussi de la concentration en composants sur lesquels peuvent se fixer l'éosine comme certains composants du plasma séminal (Björndahl et al., 2004). En colorant avec le KVE, ces composants sont dilués 4 fois dans la préparation à étaler tandis qu'ils ne sont dilués que 2 fois en colorant avec le SpermVitalstain.

L'exposition des spermatozoïdes à l'éosine semble donc bien supérieure en colorant avec le KVE qu'avec le SpermVitalstain.

De plus, l'Optidyl®, contrairement au PBS contient 20% de jaune d'œuf, du glycérol et du tampon TRIS. Jaune d'œuf et glycérol sont connus pour avoir un rôle cryoprotecteur sur les spermatozoïdes (Rodríguez-Martínez, 2003 ; Amirat et al., 2004). L'effet à court terme sur la viabilité ou la résistance des spermatozoïdes n'a pas été démontré mais l'on pourrait penser que, tout comme le plasma séminal, ces composants puissent avoir la faculté de fixer l'éosine du colorant et ainsi réduire sa concentration libre.

Il semblerait que le pH joue un rôle dans la viabilité (Liu, Foote, 1998), cependant il a été montré qu'une variation entre 6,4 et 8,5 unités de pH n'a pas d'effet sur la viabilité de spermatozoïdes de taureau soumis à une coloration à l'éosine-nigrosine (Hackett, Macpherson, 1965). De plus, les dilueurs employés contiennent des substances tampon (TRIS, et phosphate), il semble donc peu probable qu'il y ait de grandes variations de pH entre les différents mélanges finaux sperme + dilueur + colorant.

Concernant l'effet significatif ($p < 0.001$) de l'interaction entre dilueur et quantité de dilueur ajouté sur le pourcentage de spermatozoïdes morts, les différences que l'on peut observer pour chaque catégories entre les dilueurs (*i.e.* que le PBS donne des pourcentages supérieurs à l'Optidyl®) ne sont pas étonnantes étant donné que le PBS/KVE donne des pourcentages beaucoup plus élevés que les autres couples. Ce qui est remarquable, c'est que pour chaque dilueur, le taux de dilution ne semble pas avoir d'effet sur le pourcentage de spermatozoïdes morts puisque les écart-types se recoupent entre eux, ce qui est donc un résultat intéressant puisque sur le terrain nous n'avons pas forcément accès à la concentration avant de diluer lorsqu'on évalue celle-ci à l'aide d'une cellule hématimétrique par exemple. Cependant, on observe que malgré tout, la catégorie 2 possède des pourcentages (moyenne \pm écart-type = $34,7 \pm 21,4$) supérieurs aux autres catégories pour les 2 dilueurs mais de manière non significative (moyenne générale \pm écart-type = $26,3 \pm 20,4$). Ceci pourrait s'expliquer par le fait qu'il n'y a de l'éjaculat provenant que des taureaux 2 et 4 qui sont inclus dans cette catégorie. Or, si l'on regroupe les taureaux par race et par âge, le pourcentage de spermatozoïdes morts pour les taureaux de race Blond d'Aquitaine et âgés de 2 ans (T2 + T4) est de $31 \pm 21,5$, tandis que pour les taureaux de race Prim'holstein âgés de 1 an et 3 mois (T1 + T3) ce pourcentage est de $21 \pm 17,6$. Ainsi on émet l'hypothèse qu'en plus d'un effet taureau démontré par l'ANOVA (page 23, $p < 0,001$) et décrit dans la littérature (Beran et al., 2012) qu'il puisse y avoir un effet âge ou race. Cette hypothèse est plausible puisqu'il a été montré que le pourcentage de spermatozoïdes viables diminuait lorsque l'âge (catégorie de 24-36 et 36-48 mois) du taureau augmentait (Fuerst-Waltl et al., 2006), cependant, les différences restent très faibles (de l'ordre de 1%).

Nous n'avons pas observé d'effet du lecteur sur le pourcentage de spermatozoïdes morts ($p = 0.49$), ce qui est en accord avec la littérature (Menon, Thundathil, et al., 2011 ;

Łukaszewicz et al., 2008). Par ailleurs, une équipe polonaise (Łukaszewicz et al., 2008) a montré, sur des lames de spermatozoïdes de coqs colorés avec différentes techniques d'éosine-nigrosine et lues par 3 opérateurs d'expérience différente (novice, moyenne, expérimenté), que la technique de coloration a beaucoup plus d'effet que l'expérience sur le pourcentage de spermatozoïdes morts. De plus, si l'on se base sur le critère « pourcentage de spermatozoïdes morts » pour qualifier un taureau de satisfaisant (< 30%) ou non, le coefficient kappa de concordance entre les deux lecteurs est de 0,93, ce qui confirme le peu d'effet de l'expérience du lecteur.

4.3. Pourcentage d'anomalies morphologiques

Les consensus d'évaluation de la qualité de la semence des taureaux en monte naturelle admettent un maximum de 30% d'anomalies morphologiques totales pour classer le taureau 'satisfaisant' (Parkinson, 2004), avec un maximum de 15% d'anomalies majeures. La moyenne du pourcentage d'anomalies majeures pour les taureaux de l'étude au cours des quatre prélèvements est de $6,2 \pm 4,6$, avec une dispersion allant de 1 à 25,5%, ce qui est correct. Cependant, le pourcentage d'anomalies totales est de $28,5 \pm 21,4$ avec une dispersion des résultats allant de 2,5 à 84%, ce qui signifierait ici que les taureaux de l'étude seraient en moyenne, à la limite de passer « non satisfaisant » dans le cadre de monte naturelle. Ces pourcentages élevés proviennent des pourcentages d'anomalies mineures qui sont très élevées pour les taureaux de l'étude (moyenne \pm écart-type = $22,3 \pm 21,3$) avec environ 86% de ce résultat provenant d'une anomalie mineure en particulier : la queue enroulée ou repliée à l'extrémité (QR). Par ailleurs, nous avons montré qu'il existait un effet très significatif ($p < 0.001$) du dilueur et du colorant sur le pourcentage de QR, avec des moyennes allant de $1,4 \pm 1,3$ pour le couple PBS/VitalStain à $49,4 \pm 14,0$ pour le couple Optidyl®/KVE, le KVE donnant des pourcentages d'anomalies systématiquement et significativement supérieurs au VitalStain, surtout si la semence est diluée à l'aide d'Optidyl®. Il semblerait donc qu'il y ait un effet de la méthode sur le pourcentage de queues enroulées ou repliées à l'extrémité avec soit une surestimation du pourcentage de queues enroulées ou repliées à l'extrémité par le KVE, soit une sous-estimation du pourcentage de queues enroulées ou repliées à l'extrémité par le VitalStain, soit une combinaison des deux. De plus, si l'on somme les anomalies morphologiques sans prendre en compte les queues enroulées ou repliées à l'extrémité, il apparaît que les taureaux se placent dans la catégorie 'satisfaisant' (Parkinson, 2004), avec un pourcentage moyen de $9,4 \pm 5,7$ et un maximum à 42,5%, soit une moyenne bien inférieure à 30%. Si l'on prend en compte le fait que les taureaux de l'étude sont des taureaux d'insémination, c'est-à-dire dont les performances reproductrices et plus particulièrement la qualité de la semence sont contrôlées en permanence (Gérard et al., 2008), il apparaît plus probable que le nombre de QR réel est celui obtenu avec le VitalStain, et qu'il y a une surestimation artéfactuelle de ce nombre par le KVE. De plus, bien que cette anomalie ait pu être associée à un défaut lors du transit épидidymaire (Al-Makhzoomi et al., 2008) ou à un phénomène de dégénérescence testiculaire (Parkinson, 2004), elle apparaît aussi lors

d'accidents post-éjaculatoires telles que choc osmotique, choc thermique ou pH anormal (Parkinson, 2004). Il a même été décrit qu'un choc osmotique était facilement reconnaissable par la présence de queues enroulées ou repliées à l'extrémité (Barth, 2006). La vraisemblance de l'apparition d'un choc thermique reste faible compte tenu des précautions prises pour l'éviter (manipulation de la semence dans les minutes qui suivent l'éjaculation, dilueurs maintenus dans un bain marie à 37°C, colorants en bain sec). De plus, le Tableau 24 nous montre que la plus grosse variation d'osmolarité est faite en colorant au KVE une aliquote diluée à l'Optidyl® ($\Delta=259$ mOsm/kg) avec une osmolarité finale de 186 mOsm/kg. La variation d'osmolarité du couple Optidyl®/VitalStain ($\Delta=173$ mOsm/kg) est supérieure à celle du couple KVE/PBS ($\Delta=129$ mOsm/kg). Cependant, les variations d'osmolarité du couple Optidyl®/VitalStain se situent autour de la valeur physiologique (300 mOsm/kg) ce qui pourrait expliquer le fait qu'une variation si importante d'osmolarité n'ait pas d'effet sur le pourcentage de QR. Ainsi le choc osmotique reste l'hypothèse principale.

En accord avec la littérature (Menon, Thundathil, et al., 2011 ; Łukaszewicz et al., 2008), l'effet "opérateur" (qui traduit l'expérience du lecteur de lame) sur le pourcentage d'anomalies morphologiques est faible avec des différences de l'ordre de 1,5% entre lecteur expérimenté et novice. Une équipe Canadienne (Menon, Thundathil, et al., 2011) a montré qu'il y a environ 92% de concordance pour classer sur le critère 'morphologie des spermatozoïdes' des taureaux destinés à de la monte naturelle entre des praticiens vétérinaires et un andrologue qualifié, sur des lames colorées à l'éosine-nigrosine. Si l'on se base sur le pourcentage d'anomalies majeures ou le pourcentage d'anomalies mineures pour classer un taureau comme satisfaisant ou non (seuils respectifs de 15%, anomalies mineures sommées sans QR), les coefficients de concordance kappa entre les deux lecteurs de notre étude sont respectivement 0,99 et 1. Ces concordances extrêmement bonnes ne sont pas étonnantes étant donné les faibles pourcentages d'anomalies puisque, même si les pourcentages lus diffèrent entre les deux lecteurs, ils restent bien inférieurs à 15%.

Plus de la moitié des anomalies morphologiques ont un pourcentage inférieur à 1% (TA, FD, CR, AB, GD, TE, IA, AA, RP, Autre) et, excepté pour le nombre de QR, le reste des anomalies se trouve en pourcentage relativement faible. Ceci s'explique d'une part par le fait que ces taureaux appartiennent à un centre d'insémination, sont donc sélectionnés notamment sur la qualité de la semence et sont collectés de manière régulière. D'autre part, il semblerait que la méthode joue aussi sur le nombre d'anomalies visibles. Par exemple, Barth et Oko (Barth, Oko, 1989) ont montré que les anomalies de l'acrosome sont très difficiles à observer sur des lames colorées à l'éosine-nigrosine mais que cela est possible. Les "cratères" sont eux-aussi très difficiles à observer sur des lames colorées à l'éosine-nigrosine mais facile en préparation humide (mélange de semence, dilueur, et colorant observé entre lame et lamelle, sans séchage) ou en microscopie à contraste de phase (Parkinson, 2004). De même, il semblerait que les anomalies morphologiques majeures soient mieux détectées en microscopie à contraste de phase sur des préparations humides qu'en microscopie optique avec des lames colorées à l'éosine-nigrosine (Freneau et al., 2010) dont les anomalies de l'acrosome et les

cratères, ce qui pose un problème lors de l'évaluation du potentiel reproducteur du taureau puisque ces anomalies sont classées comme 'non compensables' et associées à une diminution de la fertilité (Saacke, 2008). Au contraire, certaines anomalies mineures sont surestimées (près de 6 %) lors de la lecture, en microscopie optique, de lames colorées à l'éosine nigrosine par rapport à des lames en préparation humide lues en microscopie à contraste de phase dont les têtes normales sans queue (TD) et les déformations de la pièce intermédiaire (PI) ; ces anomalies seraient des artéfacts liés à la méthode de préparation des lames (dommages mécaniques lors de l'étalement et du séchage) (Freneau et al., 2010).

Nous avons observé un effet taureau très significatif ($p < 0,001$) et un effet éjaculat ($p = 0,01$) sur le pourcentage d'anomalies majeures et d'anomalies mineures sans QR, cependant, l'étude de nos moyennes et écart-types ne mettent en évidence aucune différence significative. Néanmoins, nous avons remarqué :

- Un pourcentage plus élevé de déformations de la pièce intermédiaire (PI) et de gouttelettes cytoplasmiques distales (GD) de l'éjaculat 4 du taureau 4. On rappelle que cet éjaculat a été récolté sans bonne préparation au saut (trop rapide comparé aux autres sauts). Or il semblerait que des déformations de la pièce intermédiaire (PI) soient liées à une dégénérescence testiculaire lorsqu'associées à un fort pourcentage d'autres anomalies (Parkinson, 2004), ou d'origine génétique, ou même environnementale sans réelle preuve (Chenoweth, 2005), ce qui ne permet pas d'expliquer l'hétérogénéité de ces résultats. Au contraire, il a été montré une augmentation du nombre de gouttelettes cytoplasmiques distales (GD) lors de défaut de maturation spermatique, en cas de dysfonction épидидymaire ou de surmenage (Parkinson, 2004).
- Un pourcentage plus élevé de têtes normales sans queue (TD) chez les taureaux 2 et 4 par rapport aux autres taureaux. Il a été montré (Menon, Barkema, et al., 2011) qu'il n'y a pas d'effet significatif de la race ou de l'âge sur les pourcentages de TD, cependant, parmi les races étudiées, ne figurait pas la race Blonde d'Aquitaine.

5. Conclusion

Le couple KVE-PBS surestime significativement le pourcentage de spermatozoïdes morts par rapport aux autres couples (moyenne \pm écart-type = $54,5 \pm 14,1$). Les autres couples donnent des résultats non significativement différents, cependant même si une dilution à l'Optidyl® semble donner des résultats plus satisfaisants, la lecture des lames colorées à l'aide du couple PBS-VitalStain est beaucoup plus aisée et donc plus rapide, ce qui pourrait contribuer à limiter les erreurs de lecture.

Nous avons mis en évidence la présence artéfactuelle de queues repliées ou enroulées à l'extrémité lorsque les lames sont colorées au Kit-Vita-Eosine. Pour les anomalies majeures et le reste des anomalies mineures, le dilueur et le colorant n'ont pas d'effet significatif.

Nous n'avons pas mis en évidence d'effet de l'expérience du lecteur sur le pourcentage de spermatozoïdes morts, d'anomalies majeures et d'anomalies mineures sans queues enroulées ou repliées à l'extrémité.

Enfin, deux couples peuvent être utilisés sur le terrain : SpermVitalstain-PBS si l'on recherche la facilité de lecture (en présence d'une très bonne motilité massale, si l'on recherche des anomalies en particulier), et SpermVitalstain-Optidyl® si l'on recherche l'exactitude du résultat (dans le cas d'expertise par exemple).

6. Annexes

6.1. Mode d'emploi des colorants

Kit Vita-Eosine : Dans un tube Eppendorf, ajouter une goutte de sperme dilué et une goutte d'éosine en solution, agiter pendant 30 secondes, ajouter deux gouttes de nigrosine en solution, mélanger puis réaliser un frottis et laisser sécher à l'air.

Sperm VitalStain : Dans un tube Eppendorf, ajouter une goutte de sperme dilué et une goutte de colorant, mélanger, attendre 30 secondes puis réaliser un frottis et laisser sécher à l'air.

6.2. Résultats bruts

Les résultats bruts sont regroupés dans le Tableau 25 page 45.

Tableau 25 : Résultats bruts de l'étude. Les anomalies morphologiques sont données en nombre sur 200 spermatozoïdes comptés

Ejaculat	Taureau	Dilueur	Colorant	Lecteur lame	Volume éjaculat (mL)	Concentration éjaculat (10 ⁹ /mL)	Quantité dilueur ajouté pour 1 mL (mL)	Motilité massale	Motilité individuelle	Nspz/M	GP	TA	QE	PI	FD	CR	AB	Total Amaj	GD	TD	QR	TE	IA	AA	RP	Autre	Total Amin	Total Anomalies
1	1	1	1	1	3,5	1,73	18,8	4	4	10,0	1	1	0	0	0	0	0	2	0	1	2	0	0	0	0	0	3	5
1	1	1	1	1	3,5	1,73	18,8	4	4	5,0	1	3	3	0	0	0	0	7	2	1	2	1	0	0	0	2	8	15
1	1	1	1	2	3,5	1,73	18,8	4	4	7,5	2	1	0	0	2	0	0	5	0	0	0	1	0	0	0	0	1	6
1	1	1	1	2	3,5	1,73	18,8	4	4	9,5	0	0	1	0	2	0	0	3	0	1	1	0	0	0	1	0	3	6
1	1	1	2	1	3,5	1,73	18,8	4	4	12,5	1	6	55	0	4	0	0	66	0	1	80	0	0	0	0	0	81	147
1	1	1	2	1	3,5	1,73	18,8	4	4	7,5	0	1	49	1	0	0	0	51	0	0	105	0	0	0	0	0	105	156
1	1	1	2	2	3,5	1,73	18,8	4	4	12,0	1	3	1	3	1	2	0	11	0	0	45	4	1	2	1	0	53	64
1	1	1	2	2	3,5	1,73	18,8	4	4	8,5	1	5	1	4	2	0	0	13	0	1	74	2	0	0	0	0	77	90
1	1	2	1	1	3,5	1,73	18,8	4	3,5	11,5	4	3	1	1	0	0	0	9	4	4	4	1	0	0	0	0	13	22
1	1	2	1	1	3,5	1,73	18,8	4	3,5	18,0	2	2	3	1	0	0	0	8	0	2	10	1	0	0	0	1	14	22
1	1	2	1	2	3,5	1,73	18,8	4	3,5	14,0	2	2	1	1	3	0	0	9	1	5	0	2	0	1	0	0	9	18
1	1	2	1	2	3,5	1,73	18,8	4	3,5	10,5	4	0	2	2	1	1	1	11	1	0	1	2	0	0	0	0	4	15
1	1	2	2	1	3,5	1,73	18,8	4	3,5	34,5	0	2	6	0	0	0	1	9	0	3	96	0	0	0	1	5	105	114
1	1	2	2	1	3,5	1,73	18,8	4	3,5	47,0	0	0	2	1	0	0	0	3	0	1	69	0	0	0	0	0	70	73
1	1	2	2	2	3,5	1,73	18,8	4	3,5	46,0	1	1	2	5	1	0	1	11	0	3	40	1	0	7	1	2	54	65
1	1	2	2	2	3,5	1,73	18,8	4	3,5	32,0	2	2	1	0	1	0	0	6	0	1	42	0	0	2	0	0	45	51
1	2	1	1	1	4,9	1,24	18,8	3,5	3,5	13,5	4	1	2	0	0	0	0	7	2	4	4	0	0	0	0	0	10	17
1	2	1	1	1	4,9	1,24	18,8	3,5	3,5	16,0	3	1	2	2	0	0	0	8	2	0	2	1	0	0	1	1	7	15
1	2	1	1	2	4,9	1,24	18,8	3,5	3,5	12,5	3	0	1	0	0	0	0	4	1	3	2	1	0	0	0	0	7	11
1	2	1	1	2	4,9	1,24	18,8	3,5	3,5	10,0	5	1	3	1	0	0	0	10	0	3	1	0	0	1	0	0	5	15
1	2	1	2	1	4,9	1,24	18,8	3,5	3,5	14,5	2	0	8	0	0	0	0	10	0	5	116	0	0	0	0	1	122	132
1	2	1	2	1	4,9	1,24	18,8	3,5	3,5	11,0	2	0	2	2	1	0	0	7	0	3	98	0	0	0	2	1	104	111
1	2	1	2	2	4,9	1,24	18,8	3,5	3,5	12,0	1	1	4	0	0	0	1	7	0	1	84	0	0	0	0	1	86	93
1	2	1	2	2	4,9	1,24	18,8	3,5	3,5	12,5	2	0	2	2	1	0	0	7	0	4	78	0	0	1	0	0	83	90
1	2	2	1	1	4,9	1,24	18,8	3,5	3,5	15,0	8	1	2	5	0	0	0	16	8	6	5	2	0	0	0	0	21	37
1	2	2	1	1	4,9	1,24	18,8	3,5	3,5	21,5	7	1	1	2	0	0	0	11	6	1	6	2	0	0	0	1	16	27
1	2	2	1	2	4,9	1,24	18,8	3,5	3,5	22,5	7	0	4	1	2	1	0	15	2	13	1	1	0	0	0	0	17	32
1	2	2	1	2	4,9	1,24	18,8	3,5	3,5	14,0	3	1	4	4	1	0	0	13	4	3	2	1	0	0	0	0	10	23
1	2	2	2	1	4,9	1,24	18,8	3,5	3,5	43,5	1	0	1	0	1	0	0	3	2	2	37	0	0	0	0	0	41	44
1	2	2	2	1	4,9	1,24	18,8	3,5	3,5	48,5	0	1	3	0	0	0	0	4	1	4	40	0	0	0	1	0	46	50
1	2	2	2	2	4,9	1,24	18,8	3,5	3,5	46,0	4	2	0	4	1	0	0	11	1	1	41	0	0	10	3	0	56	67
1	2	2	2	2	4,9	1,24	18,8	3,5	3,5	43,5	3	2	4	2	1	0	0	12	0	2	32	0	0	2	1	1	38	50
1	3	1	1	1	2,6	1,59	17,2	4	4	4,0	4	1	0	1	0	0	0	6	1	3	5	1	0	0	0	0	10	16
1	3	1	1	1	2,6	1,59	17,2	4	4	8,5	10	1	0	0	0	0	0	11	3	2	6	1	0	0	1	0	13	24
1	3	1	1	2	2,6	1,59	17,2	4	4	10,0	5	0	3	2	1	0	0	11	0	1	3	2	0	0	0	0	6	17
1	3	1	1	2	2,6	1,59	17,2	4	4	14,0	6	1	2	0	0	1	0	10	1	3	3	1	0	0	1	0	9	19
1	3	1	2	1	2,6	1,59	17,2	4	4	8,0	2	1	9	0	0	0	0	12	0	1	132	0	0	0	0	0	133	145
1	3	1	2	1	2,6	1,59	17,2	4	4	5,5	4	0	4	1	0	0	1	10	0	2	134	0	0	0	0	0	136	146
1	3	1	2	2	2,6	1,59	17,2	4	4	11,0	7	2	2	2	0	0	0	13	0	1	97	0	1	0	0	1	100	113
1	3	1	2	2	2,6	1,59	17,2	4	4	9,5	7	2	3	0	0	0	0	12	1	3	102	1	0	1	4	0	112	124
1	3	2	1	1	2,6	1,59	17,2	4	4	15,0	13	2	0	2	0	0	0	17	6	2	3	0	0	0	0	0	11	28
1	3	2	1	1	2,6	1,59	17,2	4	4	19,0	12	1	2	1	0	0	0	16	6	1	4	0	0	0	1	1	13	29
1	3	2	1	2	2,6	1,59	17,2	4	4	21,5	11	0	3	2	0	0	0	16	4	1	1	0	1	1	2	0	10	26
1	3	2	1	2	2,6	1,59	17,2	4	4	21,5	20	1	3	0	1	0	0	25	3	1	3	1	1	1	1	1	12	37
1	3	2	2	1	2,6	1,59	17,2	4	4	63,0	6	0	2	0	0	0	0	8	0	1	12	0	0	0	4	0	17	25
1	3	2	2	1	2,6	1,59	17,2	4	4	63,5	5	4	4	3	0	0	0	16	1	1	10	0	0	0	2	2	16	32
1	3	2	2	2	2,6	1,59	17,2	4	4	50,0	2	1	6	1	0	0	0	10	0	4	8	1	0	6	0	0	19	29

1	3	2	2	2	2,6	1,59	17,2	4	4	47,0	3	1	4	1	0	0	0	9	0	4	9	0	0	2	0	1	16	25
1	4	1	1	1	4,6	1,60	18,8	3,5	3,5	12,0	1	10	4	2	0	0	1	18	0	6	5	1	0	0	0	0	12	30
1	4	1	1	1	4,6	1,60	18,8	3,5	3,5	11,5	0	7	3	5	0	0	2	17	1	8	0	0	0	0	0	1	10	27
1	4	1	1	2	4,6	1,60	18,8	3,5	3,5	15,5	2	0	5	1	4	1	0	13	0	6	2	2	0	2	1	0	13	26
1	4	1	1	2	4,6	1,60	18,8	3,5	3,5	16,0	2	0	4	0	1	0	0	7	1	6	0	2	0	1	1	0	11	18
1	4	1	2	1	4,6	1,60	18,8	3,5	3,5	22,5	0	9	2	3	0	0	1	15	2	12	104	1	0	0	1	3	123	138
1	4	1	2	1	4,6	1,60	18,8	3,5	3,5	26,0	0	14	8	1	0	0	0	23	0	6	99	1	0	0	0	0	106	129
1	4	1	2	2	4,6	1,60	18,8	3,5	3,5	32,5	4	1	19	4	1	0	1	30	0	12	62	1	0	0	0	0	75	105
1	4	1	2	2	4,6	1,60	18,8	3,5	3,5	18,0	1	1	6	1	0	1	1	11	0	8	99	1	0	1	0	0	109	120
1	4	2	1	1	4,6	1,60	18,8	3,5	3	27,5	0	9	2	6	1	0	1	19	1	3	6	1	0	0	0	0	11	30
1	4	2	1	1	4,6	1,60	18,8	3,5	3	32,5	0	13	2	6	0	0	1	22	2	12	9	3	0	1	1	0	28	50
1	4	2	1	2	4,6	1,60	18,8	3,5	3	34,5	8	3	5	3	6	0	3	28	3	10	2	0	0	4	2	0	21	49
1	4	2	1	2	4,6	1,60	18,8	3,5	3	27,0	5	1	11	2	0	1	1	21	0	11	0	0	0	1	2	0	14	35
1	4	2	2	1	4,6	1,60	18,8	3,5	3	66,0	0	10	0	5	1	0	1	17	0	2	11	4	0	0	1	0	18	35
1	4	2	2	1	4,6	1,60	18,8	3,5	3	69,0	0	9	2	1	0	0	0	12	0	4	17	2	0	0	0	1	24	36
1	4	2	2	2	4,6	1,60	18,8	3,5	3	65,5	1	2	8	1	3	0	0	15	1	4	18	0	0	5	0	0	28	43
1	4	2	2	2	4,6	1,6	18,8	3,5	3	57,0	0	2	3	1	2	0	1	9	0	5	12	1	0	5	2	0	25	34
2	1	1	1	1	3,4	1,87	20,3	4	4,5	8,5	1	4	2	2	0	0	0	9	0	5	6	1	0	0	0	0	12	21
2	1	1	1	1	3,4	1,87	20,3	4	4,5	11,0	0	2	0	2	0	0	0	4	0	1	2	0	0	0	0	0	3	7
2	1	1	1	2	3,4	1,87	20,3	4	4,5	16,0	2	0	2	0	0	0	0	4	0	0	1	2	0	1	0	0	4	8
2	1	1	1	2	3,4	1,87	20,3	4	4,5	11,0	2	1	3	0	0	0	0	6	1	3	2	1	0	0	0	0	7	13
2	1	1	2	1	3,4	1,87	20,3	4	4,5	12,0	0	32	1	0	1	0	0	34	0	2	94	0	0	0	0	0	96	130
2	1	1	2	1	3,4	1,87	20,3	4	4,5	11,0	2	1	31	0	0	0	0	34	0	2	100	0	0	0	0	0	102	136
2	1	1	2	2	3,4	1,87	20,3	4	4,5	16,5	0	0	2	1	0	0	0	3	0	3	89	0	0	0	1	0	93	96
2	1	1	2	2	3,4	1,87	20,3	4	4,5	10,5	0	0	6	0	0	0	0	6	0	0	95	0	0	2	1	0	98	104
2	1	2	1	1	3,4	1,87	20,3	4	3	16,0	0	3	2	4	0	0	0	9	0	4	6	0	0	0	1	1	12	21
2	1	2	1	1	3,4	1,87	20,3	4	3	13,5	2	7	4	2	0	0	0	15	2	2	2	2	0	0	2	0	10	25
2	1	2	1	2	3,4	1,87	20,3	4	3	15,0	4	1	3	0	0	0	0	8	1	3	2	1	0	1	0	0	8	16
2	1	2	1	2	3,4	1,87	20,3	4	3	16,0	4	0	3	0	1	0	1	9	1	3	1	0	0	1	0	0	6	15
2	1	2	2	1	3,4	1,87	20,3	4	3	46,0	0	1	12	0	0	0	0	13	0	3	60	0	0	0	0	0	63	76
2	1	2	2	1	3,4	1,87	20,3	4	3	47,0	1	2	11	0	0	0	0	14	0	2	65	0	0	0	0	0	67	81
2	1	2	2	2	3,4	1,87	20,3	4	3	46,5	0	0	4	2	2	0	0	8	0	1	61	0	0	0	0	0	62	70
2	1	2	2	2	3,4	1,87	20,3	4	3	45,0	2	0	2	4	1	0	0	9	0	3	69	2	0	2	1	0	77	86
2	2	1	1	1	4,5	1,54	13,3	4	4,5	14,0	5	1	1	4	1	0	0	12	6	0	3	0	0	0	0	0	9	21
2	2	1	1	1	4,5	1,54	13,3	4	4,5	16,0	3	3	1	2	1	0	0	10	3	5	4	0	0	0	0	0	12	22
2	2	1	1	2	4,5	1,54	13,3	4	4,5	14,0	6	0	4	0	0	0	0	10	0	5	3	1	0	2	1	0	12	22
2	2	1	1	2	4,5	1,54	13,3	4	4,5	13,0	3	1	10	0	0	0	0	14	2	8	0	0	1	1	0	0	12	26
2	2	1	2	1	4,5	1,54	13,3	4	4,5	22,0	0	9	0	1	0	0	0	10	1	0	44	0	0	0	0	0	45	55
2	2	1	2	1	4,5	1,54	13,3	4	4,5	21,0	3	1	6	3	0	0	0	13	0	4	84	2	0	0	0	2	92	105
2	2	1	2	2	4,5	1,54	13,3	4	4,5	12,0	2	0	4	2	0	0	0	8	0	4	85	3	0	0	1	0	93	101
2	2	1	2	2	4,5	1,54	13,3	4	4,5	17,5	0	1	6	1	2	0	0	10	0	2	58	1	0	0	1	0	62	72
2	2	2	1	1	4,5	1,54	13,3	4	3,5	22,0	1	1	2	8	0	0	0	12	3	2	6	0	0	0	0	0	11	23
2	2	2	1	1	4,5	1,54	13,3	4	3,5	21,5	5	1	3	4	0	0	0	13	4	4	1	1	0	0	0	0	10	23
2	2	2	1	2	4,5	1,54	13,3	4	3,5	17,0	6	2	5	0	1	0	0	14	5	2	0	0	0	1	1	1	10	24
2	2	2	1	2	4,5	1,54	13,3	4	3,5	22,0	3	0	4	2	0	0	0	9	4	4	0	0	0	0	0	0	8	17
2	2	2	2	1	4,5	1,54	13,3	4	3,5	42,0	1	4	7	3	0	0	0	15	0	4	50	0	0	0	2	0	56	71
2	2	2	2	1	4,5	1,54	13,3	4	3,5	50,5	1	1	8	3	0	0	0	13	0	6	38	0	0	0	0	1	45	58
2	2	2	2	2	4,5	1,54	13,3	4	3,5	42,5	3	0	6	1	0	0	0	10	0	4	42	0	0	1	0	0	47	57
2	2	2	2	2	4,5	1,54	13,3	4	3,5	51,5	3	0	5	2	0	0	0	10	0	5	36	0	0	0	1	1	43	53
2	3	1	1	1	3,2	1,31	12,5	4	4	13,5	4	4	1	10	0	0	0	19	1	1	4	0	0	0	0	0	6	25
2	3	1	1	1	3,2	1,31	12,5	4	4	6,5	6	3	2	3	0	0	0	14	4	1	7	0	0	0	0	0	12	26
2	3	1	1	2	3,2	1,31	12,5	4	4	13,0	8	1	6	2	1	0	1	19	2	4	3	0	0	0	1	1	11	30
2	3	1	1	2	3,2	1,31	12,5	4	4	8,5	6	2	1	1	1	0	0	11	0	2	1	1	0	1	0	5	10	21
2	3	1	2	1	3,2	1,31	12,5	4	4	15,5	1	3	7	4	0	0	0	15	1	3	123	0	0	0	1	0	128	143
2	3	1	2	1	3,2	1,31	12,5	4	4	8,5	7	0	14	1	0	0	0	22	2	1	127	0	0	0	1	0	131	153
2	3	1	2	2	3,2	1,31	12,5	4	4	5,5	6	1	1	0	0	0	0	8	1	0	119	3	0	0	0	0	123	131

2	3	1	2	2	3,2	1,31	12,5	4	4	11,5	5	1	4	2	0	0	0	12	1	2	114	1	0	0	0	0	118	130
2	3	2	1	1	3,2	1,31	12,5	4	4	10,0	2	3	2	16	0	0	0	23	4	0	3	0	0	0	0	1	8	31
2	3	2	1	1	3,2	1,3	12,5	4	4	10,5	1	2	2	18	0	0	0	23	3	0	1	0	0	0	0	0	4	27
2	3	2	1	2	3,2	1,3	12,5	4	4	6,0	20	1	0	1	0	0	0	22	0	2	0	2	0	0	0	0	4	26
2	3	2	1	2	3,2	1,3	12,5	4	4	10,0	3	2	1	2	0	1	0	9	3	1	2	0	0	1	0	0	7	16
2	3	2	2	1	3,2	1,3	12,5	4	4	37,0	4	0	1	5	0	0	0	10	2	3	72	0	0	0	1	0	78	88
2	3	2	2	1	3,2	1,3	12,5	4	4	34,5	2	2	8	6	0	0	0	18	0	3	66	1	0	0	0	1	71	89
2	3	2	2	2	3,2	1,3	12,5	4	4	29,5	4	0	2	3	1	1	0	11	0	0	78	1	0	2	1	0	82	93
2	3	2	2	2	3,2	1,3	12,5	4	4	32,5	9	0	1	0	0	0	0	10	1	0	83	1	0	2	0	0	87	97
2	4	1	1	1	7,3	1,1	9,0	3,5	3,5	13,5	0	6	4	7	1	0	0	18	0	7	0	0	0	0	0	0	7	25
2	4	1	1	1	7,3	1,1	9,0	3,5	3,5	14,0	0	2	4	5	1	0	0	12	1	4	1	2	0	0	0	0	8	20
2	4	1	1	2	7,3	1,1	9,0	3,5	3,5	6,0	2	1	2	1	0	0	0	6	2	2	0	1	0	0	0	0	5	11
2	4	1	1	2	7,3	1,1	9,0	3,5	3,5	10,0	0	0	3	1	1	0	1	6	1	2	3	4	1	1	0	0	12	18
2	4	1	2	1	7,3	1,1	9,0	3,5	3,5	16,0	0	2	10	4	1	0	0	17	0	3	107	0	0	0	0	0	110	127
2	4	1	2	1	7,3	1,1	9,0	3,5	3,5	18,0	1	7	18	2	0	0	1	29	0	7	86	0	0	0	0	1	94	123
2	4	1	2	2	7,3	1,1	9,0	3,5	3,5	17,0	1	3	1	1	0	0	0	6	0	3	72	0	0	1	1	0	77	83
2	4	1	2	2	7,3	1,1	9,0	3,5	3,5	19,0	0	2	3	1	1	0	0	7	0	3	90	1	1	0	0	0	95	102
2	4	2	1	1	7,3	1,1	9,0	3,5	3,5	26,0	0	3	2	11	0	0	0	16	2	4	4	0	0	0	0	1	11	27
2	4	2	1	1	7,3	1,1	9,0	3,5	3,5	27,5	0	3	4	10	0	0	0	17	4	5	0	1	0	0	0	1	11	28
2	4	2	1	2	7,3	1,1	9,0	3,5	3,5	16,5	4	3	3	1	0	0	0	11	2	2	2	1	0	2	0	0	9	20
2	4	2	1	2	7,3	1,1	9,0	3,5	3,5	24,0	2	2	3	0	0	0	0	7	2	2	0	0	0	1	0	0	5	12
2	4	2	2	1	7,3	1,1	9,0	3,5	3,5	63,0	0	0	4	1	0	0	2	7	0	3	38	0	0	0	0	0	41	48
2	4	2	2	1	7,3	1,1	9,0	3,5	3,5	70,5	0	3	4	3	0	0	1	11	0	3	36	0	0	0	0	1	40	51
2	4	2	2	2	7,3	1,1	9,0	3,5	3,5	64,5	1	1	4	2	0	0	0	8	0	0	35	2	0	0	0	0	37	45
2	4	2	2	2	7,3	1,1	9,0	3,5	3,5	68,0	4	1	3	0	1	0	0	9	0	7	36	3	0	0	0	0	46	55
3	1	1	1	1	5,4	2,3	25,5	4	4	15,0	0	1	2	0	2	0	0	5	0	1	1	2	0	0	0	0	4	9
3	1	1	1	1	5,4	2,3	25,5	4	4	10,5	0	0	0	3	0	0	0	3	0	1	2	0	0	0	1	0	4	7
3	1	1	1	2	5,4	2,3	25,5	4	4	5,0	0	3	2	1	0	0	0	6	0	3	0	2	0	1	0	0	6	12
3	1	1	1	2	5,4	2,3	25,5	4	4	8,5	1	0	1	2	0	0	0	4	1	3	0	1	0	0	0	0	5	9
3	1	1	2	1	5,4	2,3	25,5	4	4	18,0	2	1	29	1	0	0	0	33	0	3	72	0	0	0	0	1	76	109
3	1	1	2	1	5,4	2,3	25,5	4	4	17,5	0	1	37	0	1	0	0	39	0	2	87	0	0	0	0	1	90	129
3	1	1	2	2	5,4	2,3	25,5	4	4	17,0	1	0	4	2	0	0	0	7	1	0	87	0	0	0	0	0	88	95
3	1	1	2	2	5,4	2,3	25,5	4	4	18,5	1	0	2	2	0	0	0	5	0	2	84	0	0	0	0	0	86	91
3	1	2	1	1	5,4	2,3	25,5	4	3	51,5	1	1	2	2	1	0	0	7	1	4	2	1	0	0	0	2	10	17
3	1	2	1	1	5,4	2,3	25,5	4	3	42,0	1	1	3	3	1	0	0	9	0	1	6	1	0	0	3	1	12	21
3	1	2	1	2	5,4	2,3	25,5	4	3	50,5	1	0	4	0	2	0	0	7	1	3	3	0	0	1	0	1	9	16
3	1	2	1	2	5,4	2,3	25,5	4	3	45,5	4	0	4	2	0	0	1	11	1	2	0	3	0	0	0	0	6	17
3	1	2	2	1	5,4	2,3	25,5	4	3	72,0	0	1	7	0	2	0	0	10	0	0	50	0	0	0	0	0	50	60
3	1	2	2	1	5,4	2,3	25,5	4	3	69,5	0	1	3	0	0	0	0	4	0	0	54	0	0	0	0	1	55	59
3	1	2	2	2	5,4	2,3	25,5	4	3	58,5	2	1	0	2	0	0	0	5	0	1	49	0	0	0	0	0	50	55
3	1	2	2	2	5,4	2,3	25,5	4	3	66,0	1	0	2	1	0	0	0	4	1	2	53	1	0	0	0	0	57	61
3	2	1	1	1	5,1	2,0	17,3	4	4	14,5	0	2	1	1	0	0	0	4	2	3	3	0	0	0	0	1	9	13
3	2	1	1	1	5,1	2,0	17,3	4	4	21,0	3	3	6	1	0	0	0	13	3	1	1	0	0	0	0	0	5	18
3	2	1	1	2	5,1	2,0	17,3	4	4	17,0	5	2	3	4	0	0	0	14	0	5	3	1	0	1	1	0	11	25
3	2	1	1	2	5,1	2,0	17,3	4	4	16,5	2	0	7	4	0	0	0	13	0	2	0	1	0	0	0	0	3	16
3	2	1	2	1	5,1	2,0	17,3	4	4	31,5	0	1	8	3	1	0	0	13	0	4	58	1	0	0	1	0	64	77
3	2	1	2	1	5,1	2,0	17,3	4	4	34,5	0	1	10	1	0	0	0	12	1	4	44	1	0	0	0	1	51	63
3	2	1	2	2	5,1	2,0	17,3	4	4	36,5	4	1	6	2	0	0	0	13	0	6	54	0	0	1	0	0	61	74
3	2	1	2	2	5,1	2,0	17,3	4	4	35,0	2	3	3	2	0	0	0	10	0	2	46	0	0	0	0	1	49	59
3	2	2	1	1	5,1	2,0	17,3	4	2,5	66,5	3	4	6	3	1	0	0	17	4	7	3	0	0	0	1	0	15	32
3	2	2	1	1	5,1	2,0	17,3	4	2,5	63,5	7	2	7	0	0	0	0	16	6	10	7	0	0	0	0	0	23	39
3	2	2	1	2	5,1	2,0	17,3	4	2,5	63,5	6	3	1	1	0	0	0	11	2	5	4	0	0	1	1	0	13	24
3	2	2	1	2	5,1	2,0	17,3	4	2,5	71,0	3	2	5	0	1	0	0	11	1	8	2	1	0	0	0	0	12	23
3	2	2	2	1	5,1	2,0	17,3	4	2,5	71,0	1	3	4	0	0	0	0	8	2	3	25	0	0	0	0	0	30	38
3	2	2	2	1	5,1	2,0	17,3	4	2,5	78,5	1	5	5	2	0	0	0	13	0	6	32	0	0	0	3	0	41	54
3	2	2	2	2	5,1	2,0	17,3	4	2,5	87,0	0	0	3	1	1	0	0	5	0	5	19	0	0	0	1	3	28	33

3	2	2	2	2	5,1	2,0	17,3	4	2,5	82,5	0	1	2	2	1	0	0	6	0	1	24	0	0	0	2	0	27	33	
3	3	1	1	1	3,6	1,8	17,3	4,5	4	9,0	5	1	0	3	1	0	0	10	6	2	6	2	0	0	0	0	16	26	
3	3	1	1	1	3,6	1,8	17,3	4,5	4	6,0	12	2	5	0	0	0	0	19	1	2	9	0	0	0	0	0	12	31	
3	3	1	1	2	3,6	1,8	17,3	4,5	4	6,0	4	0	1	1	0	0	0	6	2	1	3	2	0	0	0	2	10	16	
3	3	1	1	2	3,6	1,8	17,3	4,5	4	6,5	6	1	2	0	0	0	0	9	0	0	1	3	0	0	1	0	5	14	
3	3	1	2	1	3,6	1,8	17,3	4,5	4	4,0	3	1	14	0	0	0	0	18	0	1	148	0	0	0	0	1	150	168	
3	3	1	2	1	3,6	1,8	17,3	4,5	4	5,5	6	0	6	1	0	0	0	13	0	1	148	0	0	0	0	0	149	162	
3	3	1	2	2	3,6	1,8	17,3	4,5	4	12,0	0	0	2	1	0	0	0	3	0	3	107	0	0	0	0	1	111	114	
3	3	1	2	2	3,6	1,8	17,3	4,5	4	10,5	4	0	3	2	2	0	0	11	0	2	141	0	0	0	1	0	144	155	
3	3	2	1	1	3,6	1,8	17,3	4,5	3,5	10,0	20	4	3	0	0	0	0	27	8	4	1	1	0	0	0	0	14	41	
3	3	2	1	1	3,6	1,8	17,3	4,5	3,5	17,5	12	2	2	0	1	0	0	17	4	3	6	1	0	1	0	1	16	33	
3	3	2	1	2	3,6	1,8	17,3	4,5	3,5	8,0	12	0	0	0	0	0	0	12	3	3	2	1	0	0	0	0	9	21	
3	3	2	1	2	3,6	1,8	17,3	4,5	3,5	12,5	12	2	0	3	0	0	0	1	18	3	4	0	1	0	0	0	1	9	27
3	3	2	2	1	3,6	1,8	17,3	4,5	3,5	43,0	3	2	2	0	0	0	0	7	2	0	70	0	0	0	0	0	72	79	
3	3	2	2	1	3,6	1,8	17,3	4,5	3,5	48,0	2	0	3	0	0	0	0	5	1	0	60	0	0	0	0	0	61	66	
3	3	2	2	2	3,6	1,8	17,3	4,5	3,5	35,5	3	0	5	0	0	0	0	8	0	1	53	0	0	0	0	0	54	62	
3	3	2	2	2	3,6	1,8	17,3	4,5	3,5	46,5	2	1	1	3	1	0	0	8	0	6	57	0	0	3	1	2	69	77	
3	4	1	1	1	4,3	1,3	11,5	3,5	3	9,0	0	1	2	0	0	0	0	3	0	8	1	1	0	0	1	1	12	15	
3	4	1	1	1	4,3	1,3	11,5	3,5	3	9,5	1	2	4	1	0	0	0	8	2	4	2	0	0	0	1	0	9	17	
3	4	1	1	2	4,3	1,3	11,5	3,5	3	10,5	1	1	5	0	0	0	0	7	0	4	0	1	0	1	0	0	6	13	
3	4	1	1	2	4,3	1,3	11,5	3,5	3	6,5	3	1	2	0	0	0	0	6	1	3	0	2	0	0	0	0	6	12	
3	4	1	2	1	4,3	1,3	11,5	3,5	3	14,0	1	0	10	0	0	0	0	11	0	1	134	1	0	0	0	0	136	147	
3	4	1	2	1	4,3	1,3	11,5	3,5	3	15,0	1	4	8	1	2	0	0	16	0	4	139	1	0	0	0	0	144	160	
3	4	1	2	2	4,3	1,3	11,5	3,5	3	14,5	1	1	1	1	0	0	0	4	0	1	116	0	0	0	0	0	117	121	
3	4	1	2	2	4,3	1,3	11,5	3,5	3	18,0	1	1	3	1	1	0	0	7	0	4	115	0	0	0	0	0	119	126	
3	4	2	1	1	4,3	1,3	11,5	3,5	3	18,5	1	1	6	1	0	0	0	9	4	3	2	1	0	0	0	0	10	19	
3	4	2	1	1	4,3	1,3	11,5	3,5	3	13,0	0	0	2	2	0	0	0	4	2	2	8	0	0	0	0	1	13	17	
3	4	2	1	2	4,3	1,3	11,5	3,5	3	17,0	0	1	2	3	0	0	0	6	0	3	4	0	0	0	1	0	8	14	
3	4	2	1	2	4,3	1,3	11,5	3,5	3	17,5	3	1	4	3	2	0	0	13	1	9	2	1	0	0	0	0	13	26	
3	4	2	2	1	4,3	1,3	11,5	3,5	3	80,0	0	1	3	0	0	0	0	4	0	3	40	0	0	0	0	0	43	47	
3	4	2	2	1	4,3	1,3	11,5	3,5	3	75,5	1	1	2	0	1	0	0	5	1	5	48	0	0	0	0	4	58	63	
3	4	2	2	2	4,3	1,3	11,5	3,5	3	72,0	1	1	2	1	2	0	0	7	0	1	38	0	0	0	0	1	40	47	
3	4	2	2	2	4,3	1,3	11,5	3,5	3	74,0	1	0	4	4	1	0	0	10	1	3	35	0	0	0	0	1	40	50	
4	1	1	1	1	4,1	1,5	15,8	4	4	6,5	1	4	2	2	0	0	0	9	2	0	3	1	0	0	0	0	6	15	
4	1	1	1	1	4,1	1,5	15,8	4	4	8,0	0	2	0	4	0	0	0	6	1	0	2	3	0	0	0	0	6	12	
4	1	1	1	2	4,1	1,5	15,8	4	4	13,0	1	2	3	1	3	0	0	10	0	1	2	1	0	1	0	0	5	15	
4	1	1	1	2	4,1	1,5	15,8	4	4	10,5	2	1	4	1	0	0	0	8	0	2	1	1	0	2	0	0	6	14	
4	1	1	2	1	4,1	1,5	15,8	4	4	8,0	0	2	7	2	0	0	0	11	0	1	108	1	0	0	0	0	110	121	
4	1	1	2	1	4,1	1,5	15,8	4	4	7,0	0	3	6	0	0	0	0	9	1	0	119	0	0	0	0	0	120	129	
4	1	1	2	2	4,1	1,5	15,8	4	4	11,0	0	1	3	1	1	1	0	7	0	3	115	3	0	1	0	0	122	129	
4	1	1	2	2	4,1	1,5	15,8	4	4	8,0	0	1	3	2	0	0	0	6	0	0	112	1	0	0	1	0	114	120	
4	1	2	1	1	4,1	1,5	15,8	4	2,5	11,0	0	5	4	4	1	0	0	14	1	2	4	0	0	0	0	1	8	22	
4	1	2	1	1	4,1	1,5	15,8	4	2,5	11,0	0	4	1	8	0	0	0	13	0	2	3	1	0	0	0	0	6	19	
4	1	2	1	2	4,1	1,5	15,8	4	2,5	14,5	1	1	0	2	1	0	0	5	0	4	0	3	0	0	1	0	8	13	
4	1	2	1	2	4,1	1,5	15,8	4	2,5	16,0	0	2	1	1	2	0	0	6	1	2	0	3	0	0	1	0	7	13	
4	1	2	2	1	4,1	1,5	15,8	4	2,5	54,5	1	2	1	0	0	0	0	4	0	1	74	1	0	0	0	0	76	80	
4	1	2	2	1	4,1	1,5	15,8	4	2,5	51,0	1	1	1	0	1	0	0	4	0	1	87	0	0	0	0	0	88	92	
4	1	2	2	2	4,1	1,5	15,8	4	2,5	40,0	0	0	3	1	0	0	0	4	0	1	97	0	0	0	0	0	98	102	
4	1	2	2	2	4,1	1,5	15,8	4	2,5	40,5	1	0	5	0	1	0	0	7	0	0	95	0	0	0	2	0	97	104	
4	2	1	1	1	7,8	1,1	9,3	3,5	3,5	16,5	1	3	0	5	1	0	0	10	1	4	6	2	0	0	0	0	13	23	
4	2	1	1	1	7,8	1,1	9,3	3,5	3,5	20,5	2	3	4	5	0	0	0	14	2	3	5	1	0	0	1	1	13	27	
4	2	1	1	2	7,8	1,1	9,3	3,5	3,5	24,0	0	0	1	2	1	0	0	4	1	3	3	4	0	0	0	0	11	15	
4	2	1	1	2	7,8	1,1	9,3	3,5	3,5	20,0	3	0	4	0	0	0	0	7	2	4	3	2	0	0	0	0	11	18	
4	2	1	2	1	7,8	1,1	9,3	3,5	3,5	21,5	1	1	3	2	0	0	0	7	0	2	66	1	0	0	0	0	69	76	
4	2	1	2	1	7,8	1,1	9,3	3,5	3,5	26,0	0	1	3	6	1	0	0	11	0	5	74	0	0	0	1	0	80	91	
4	2	1	2	2	7,8	1,1	9,3	3,5	3,5	28,0	2	1	2	0	0	0	0	5	0	5	75	0	0	0	1	0	81	86	

4	2	1	2	2	7,8	1,1	9,3	3,5	3,5	28,5	1	0	3	1	0	0	0	5	0	1	67	0	0	0	0	0	68	73
4	2	2	1	1	7,8	1,1	9,3	3,5	3	49,5	0	1	5	10	0	0	0	16	3	4	5	0	0	0	2	0	14	30
4	2	2	1	1	7,8	1,1	9,3	3,5	3	45,0	2	1	4	10	0	0	0	17	1	4	3	1	0	0	0	1	10	27
4	2	2	1	2	7,8	1,1	9,3	3,5	3	47,5	4	0	4	3	2	0	0	13	0	1	1	1	0	0	0	1	4	17
4	2	2	1	2	7,8	1,1	9,3	3,5	3	42,5	3	0	2	2	1	0	0	8	0	3	0	0	0	0	0	1	4	12
4	2	2	2	1	7,8	1,1	9,3	3,5	3	56,0	0	0	2	3	1	0	0	6	0	4	54	1	0	0	0	1	60	66
4	2	2	2	1	7,8	1,1	9,3	3,5	3	64,5	0	2	2	0	0	0	0	4	0	0	25	0	0	0	0	0	25	29
4	2	2	2	2	7,8	1,1	9,3	3,5	3	76,0	1	3	5	6	2	0	0	17	0	1	37	0	0	0	0	1	39	56
4	2	2	2	2	7,8	1,1	9,3	3,5	3	70,0	0	0	6	1	0	0	0	7	0	3	41	1	0	1	1	0	47	54
4	3	1	1	1	3,3	1,9	18,0	4	4	7,5	1	0	4	10	1	0	1	17	2	1	1	0	0	0	0	0	4	21
4	3	1	1	1	3,3	1,9	18,0	4	4	12,0	0	6	4	15	0	0	0	25	2	0	5	1	0	0	0	1	9	34
4	3	1	1	2	3,3	1,9	18,0	4	4	6,0	6	0	1	4	2	0	0	13	0	0	1	2	0	0	1	0	4	17
4	3	1	1	2	3,3	1,9	18,0	4	4	6,5	6	2	1	4	2	0	0	15	0	0	0	1	0	0	0	0	1	16
4	3	1	2	1	3,3	1,9	18,0	4	4	6,5	3	0	7	5	0	0	0	15	1	2	135	0	0	0	0	0	138	153
4	3	1	2	1	3,3	1,9	18,0	4	4	11,5	1	0	2	7	0	0	1	11	0	1	131	0	0	0	0	2	134	145
4	3	1	2	2	3,3	1,9	18,0	4	4	12,0	7	1	1	0	1	0	0	10	0	4	138	1	0	1	0	0	144	154
4	3	1	2	2	3,3	1,9	18,0	4	4	9,5	3	2	2	0	0	0	0	7	0	2	141	1	0	0	0	0	144	151
4	3	2	1	1	3,3	1,9	18,0	4	3,5	17,5	2	2	3	18	1	0	0	26	5	5	4	0	0	0	0	0	14	40
4	3	2	1	1	3,3	1,9	18,0	4	3,5	12,5	3	1	1	12	0	0	0	17	2	1	2	0	0	0	0	0	5	22
4	3	2	1	2	3,3	1,9	18,0	4	3,5	6,5	6	1	3	0	1	0	0	11	1	2	0	1	0	1	0	0	5	16
4	3	2	1	2	3,3	1,9	18,0	4	3,5	12,0	10	1	2	0	0	0	0	13	0	6	0	0	0	0	0	0	6	19
4	3	2	2	1	3,3	1,9	18,0	4	3,5	48,5	2	1	1	5	0	0	0	9	0	1	52	0	0	0	0	0	53	62
4	3	2	2	1	3,3	1,9	18,0	4	3,5	47,5	0	3	3	5	0	0	0	11	0	7	75	0	0	0	2	0	84	95
4	3	2	2	2	3,3	1,9	18,0	4	3,5	42,5	5	0	0	3	0	0	0	8	0	6	75	2	0	0	0	0	83	91
4	3	2	2	2	3,3	1,9	18,0	4	3,5	52,0	5	1	2	0	0	0	0	8	0	1	81	1	0	0	0	0	83	91
4	4	1	1	1	1,9	0,4	2,8	2	2	16,0	2	5	8	19	1	0	0	35	6	4	12	0	0	0	1	0	23	58
4	4	1	1	1	1,9	0,4	2,8	2	2	11,0	0	2	5	14	0	0	2	23	16	6	9	0	0	0	0	2	33	56
4	4	1	1	2	1,9	0,4	2,8	2	2	9,5	1	1	9	5	0	0	0	16	9	5	0	2	0	1	0	0	17	33
4	4	1	1	2	1,9	0,4	2,8	2	2	10,0	2	1	5	2	0	0	0	10	20	2	1	0	0	1	0	1	25	35
4	4	1	2	1	1,9	0,4	2,8	2	2	16,5	0	1	9	2	0	0	0	12	3	4	107	1	0	0	1	2	118	130
4	4	1	2	1	1,9	0,4	2,8	2	2	14,5	1	4	4	2	1	0	0	12	0	5	115	0	0	0	1	0	121	133
4	4	1	2	2	1,9	0,4	2,8	2	2	13,0	1	3	7	2	0	0	0	13	1	6	135	0	0	0	0	0	142	155
4	4	1	2	2	1,9	0,4	2,8	2	2	22,0	2	1	4	1	1	0	0	9	0	3	106	0	0	0	0	0	109	118
4	4	2	1	1	1,9	0,4	2,8	2	1	15,0	0	1	11	47	1	0	0	60	5	2	6	1	0	0	0	0	14	74
4	4	2	1	1	1,9	0,4	2,8	2	1	16,5	0	1	8	62	0	0	0	71	10	4	9	0	0	0	0	0	23	94
4	4	2	1	2	1,9	0,4	2,8	2	1	11,5	2	2	6	5	3	0	0	18	26	1	0	1	0	1	0	0	29	47
4	4	2	1	2	1,9	0,4	2,8	2	1	10,0	3	0	10	3	2	0	0	18	36	3	1	0	0	2	0	0	42	60
4	4	2	2	1	1,9	0,4	2,8	2	1	52,5	0	1	15	14	1	0	0	31	0	4	49	1	0	0	0	0	54	85
4	4	2	2	1	1,9	0,4	2,8	2	1	48,0	0	5	15	21	0	0	0	41	0	18	51	2	0	0	0	2	73	114
4	4	2	2	2	1,9	0,4	2,8	2	1	44,0	1	1	4	0	0	0	0	6	1	4	72	0	0	0	0	1	78	84
4	4	2	2	2	1,9	0,4	2,8	2	1	46,5	0	2	9	4	0	0	0	15	13	1	82	0	0	0	0	0	96	111

7. Bibliographie

AL-MAKHZOOMI, A., LUNDEHEIM, N., HÅÅRD, M. et RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H., 2008. Sperm morphology and fertility of progeny-tested AI dairy bulls in Sweden. In : *Theriogenology*. 1 septembre 2008. Vol. **70**, n° 4, p. 682-691.

AMIRAT, L, ANTON, M, TAINTURIER, D, CHATAGNON, G, BATTUT, I et COURTENS, J, 2005. Modifications of bull spermatozoa induced by three extenders: Biociphos, low density lipoprotein and Triladyl, before, during and after freezing and thawing. In : *Reproduction*. 1 avril 2005. Vol. **129**, n° 4, p. 535-543.

AMIRAT, L, TAINURIER, D, JEANNEAU, L, THORIN, C, GÉRARD, O, COURTENS, J et ANTON, M, 2004. Bull semen in vitro fertility after cryopreservation using egg yolk LDL: a comparison with Optidyl®, a commercial egg yolk extender. In : *Theriogenology*. 1 avril 2004. Vol. **61**, n° 5, p. 895-907.

ARTHUR, G, 2001. Chapter 30 - Fertility and infertility in male animals. In : NOAKES, D, PEARSON, H, PARKINSON, T. J. et ARTHUR, G (éd.), *Arthur's Veterinary Reproduction and Obstetrics (Eighth Edition)*. Oxford : W.B. Saunders. p. 695-750.

BARTH, A. D., 2006. Chapter 31 - Evaluation of potential breeding soundness of the bull. In : *Current Therapy in Large Animal Theriogenology*. St. Louis : Elsevier Health Sciences.

BARTH, A. D. et OKO, R. J. (éd.), 1989. *Abnormal morphology of bovine spermatozoa*. Ames, Iowa, U.S.A. : Iowa State University Press.

BERAN, J, STADNIK, L et BEZDICEK, J, 2012. Effect of sire and extender on sperm motility and share of live or dead sperm in bulls' fresh ejaculate and in AI doses after thawing. In : *Leibniz Institute for Farm Animal Biology*. Archiv Tierzucht. Dummerstorf, Germany, 2012. p. 207-218.

BJÖRNDAHL, L, SÖDERLUND, I, JOHANSSON, S, MOHAMMADIEH, M, POURIAN, M et KVIST, U, 2004. Why the WHO Recommendations for Eosin-Nigrosin Staining Techniques for Human Sperm Vitality Assessment Must Change. In : *Journal of Andrology*. 10 septembre 2004. Vol. **25**, n° 5, p. 671-678.

CHENOWETH, P. J., 2002. Bull breeding soundness exams and beyond. In : *The applied reproductive strategies in beef cattle workshop*. Manhattan, Kansas : ARSBC. 5 septembre 2002.

CHENOWETH, P. J., 2004. Evaluation of natural service bulls – The « other » BSE. In : *The Veterinary Journal*. novembre 2004. Vol. **168**, n° 3, p. 211-212.

CHENOWETH, P. J., 2005. Genetic sperm defects. In : *Theriogenology*. août 2005. Vol. **64**, n° 3, p. 457-468.

DUMONT, P, 1997. Appréciation de la fonction sexuelle du taureau reproducteur. In : *Le Point Vétérinaire*. 1997. Vol. **28**, n° 185, p. 19-30.

ELIASSON, R et TREICHL, MB, 1971. Supravital staining of human spermatozoa. In : *Fertility and Sterility*. 1971. Vol. **22**, p. 134-137.

ESTEBAN-GIL, A, GRISEZ, C, PREVOT, F, FLORENTIN, S, DECAUDIN, A, PICARD-HAGEN, N, BERTHELOT, X, RONSIN, P, ALZIEU, J. P., MAROIS, M, CORBOZ, N., PEGLION, M., VILARDELL, C., LIÉNARD, E., BOUHSIRA, E., CASTILLO, J. A., FRANC, M. et JACQUIET, P., 2014. No detection of *Besnoitia besnoiti* DNA in the semen of

chronically infected bulls. In : *Parasitology Research*. 7 mai 2014. Vol. **113**, n° 6, p. 2355-2362.

FRANCE GÉNÉTIQUE ELEVAGE, 2015. *Dispositif génétique, chiffres clés ruminants 2014*. février 2015. France Génétique Elevage. Paris

FRENEAU, G. E., CHENOWETH, P. J., ELLIS, R. et RUPP, G., 2010. Sperm morphology of beef bulls evaluated by two different methods. In : *Animal Reproduction Science*. avril 2010. Vol. **118**, n° 2-4, p. 176-181.

FUERST-WALTL, B., SCHWARZENBACHER, H., PERNER, C. et SÖLKNER, J., 2006. Effects of age and environmental factors on semen production and semen quality of Austrian Simmental bulls. In : *Animal Reproduction Science*. septembre 2006. Vol. **95**, n° 1-2, p. 27-37.

GÉRARD, O, PONSART, C, PETIT, M et HUMBLLOT, P, 2008. Evolution des techniques de préparation de la semence et d'insémination artificielle chez les bovins. In : *Rencontres Recherches Ruminants*. Paris : décembre 2008.

HACKETT, A. J. et MACPHERSON, J. W., 1965. Some Staining Procedures for Spermatozoa. In : *The Canadian Veterinary Journal*. mars 1965. Vol. **6**, n° 3, p. 55-62.

LIU, Z. et FOOTE, R. H., 1998. Bull Sperm Motility and Membrane Integrity in Media Varying in Osmolality. In : *Journal of Dairy Science*. juillet 1998. Vol. **81**, n° 7, p. 1868-1873.

ŁUKASZEWICZ, E., JERYSZ, A., PARTYKA, A. et SIUDZIŃSKA, A., 2008. Efficacy of evaluation of rooster sperm morphology using different staining methods. In : *Research in Veterinary Science*. décembre 2008. Vol. **85**, n° 3, p. 583-588.

MAYER, D. T., SQUIERS, C. D., BOGART, R. et OLOUFA, M. M., 1951. The technique for characterizing mammalian spermatozoa as dead or living by differential staining. In : *Journal of Animal Science*. février 1951. Vol. **10**, n° 1, p. 226-235.

MENON, A.G., BARKEMA, H.W., WILDE, R, KASTELIC, J.P. et THUNDATHIL, J.C., 2011. Associations between sperm abnormalities, breed, age, and scrotal circumference in beef bulls. In : *Canadian Journal of Veterinary Research*. octobre 2011. Vol. **75**, n° 4, p. 241-247.

MENON, A.G., THUNDATHIL, J.C., WILDE, R. P., KASTELIC, J.P. et BARKEMA, H.W., 2011. Validating the assessment of bull sperm morphology by veterinary practitioners. In : *The Canadian Veterinary Journal*. avril 2011. Vol. **52**, n° 4, p. 407-408.

MOCÉ, E. et GRAHAM, J. K., 2008. In vitro evaluation of sperm quality. In : *Animal Reproduction Science*. avril 2008. Vol. **105**, n° 1-2, p. 104-118.

PARKINSON, T. J., 2004. Evaluation of fertility and infertility in natural service bulls. In : *The Veterinary Journal*. novembre 2004. Vol. **168**, n° 3, p. 215-229.

RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H, 2003. Laboratory Semen Assessment and Prediction of Fertility: still Utopia?*. In : *Reproduction in Domestic Animals*. 1 août 2003. Vol. **38**, n° 4, p. 312-318.

ROSSATO, M., BALERCIA, G., LUCARELLI, G., FORESTA, C. et MANTERO, F., 2002. Role of seminal osmolarity in the regulation of human sperm motility. In : *International Journal of Andrology*. 1 août 2002. Vol. **25**, n° 4, p. 230-235.

SAACKE, R. G., 2008. Sperm morphology: Its relevance to compensable and uncompensable traits in semen. In : *Theriogenology*. août 2008. Vol. **70**, n° 3, p. 473-478.

SELLEM, E., BROEKHUIJSE, M. L. W. J., CHEVRIER, L., CAMUGLI, S., SCHMITT, E., SCHIBLER, L. et KOENEN, E. P. C., 2015. Use of combinations of in vitro quality assessments to predict fertility of bovine semen. In : *Theriogenology*. 2015.

SILVA, P. F. N., 2006. Detection of damage in mammalian sperm cells. In : *Theriogenology*. 15 mars 2006. Vol. **65**, n° 5, p. 958-978.

THERMOFISHERSCIENTIFIC, 2015. DPBS, no calcium, no magnesium. In : <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/14190250>. 2015.

AGREMENT SCIENTIFIQUE

En vue de l'obtention du permis d'imprimer de la thèse de doctorat vétérinaire

Je soussigné, *Xavier BERTHELOT*, Enseignant-chercheur, de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, directeur de thèse, certifie avoir examiné la thèse de *DESSAY Sabine* intitulée « *Etude de l'effet du dilueur et du colorant sur la viabilité et les anomalies morphologiques des spermatozoïdes de taureau.* » et que cette dernière peut être imprimée en vue de sa soutenance.

Fait à Toulouse, le 23 novembre 2015
Professeur Xavier BERTHELOT
Enseignant chercheur
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse



Vu :
La Directrice de l'Ecole Nationale
Vétérinaire de Toulouse
Isabelle CHMITELIN



Vu :
Le Président du jury :
Professeur ~~Professeur Louis BUIAN~~
Professeur Louis BUIAN
Directeur EA 3694
Groupe de Recherche en Fertilité Humaine
Université Toulouse III
Hôpital Paule de Viguier - 330 av. Grande Bretagne
31059 TOULOUSE cedex 9



Vu et autorisation de l'impression :
Administrateur Provisoire de
l'Université
Paul Sabatier
Monsieur Amal SAYAH
Administrateur Provisoire



Mlle DESSAY Sabine
a été admis(e) sur concours en : 2010
a obtenu son diplôme d'études fondamentales vétérinaires le : 25/06/2014
a validé son année d'approfondissement le : 24/09/2015
n'a plus aucun stage, ni enseignement optionnel à valider.



NOM : DESSAY **PRENOM** : SABINE

TITRE : ETUDE DE L'EFFET DU COLORANT ET DU DILUEUR SUR LA VIABILITE ET LE POURCENTAGE D'ANOMALIES MORPHOLOGIQUES DE SPERMATOZOÏDES FRAIS DE TAUREAUX

RESUME : La morphologie ainsi que le pourcentage des spermatozoïdes morts dans de la semence fraîche de taureau de monte naturelle ou d'insémination est reliée à sa fertilité. De nombreuses techniques de coloration existent, dont l'éosine-nigrosine, qui permet une lecture simultanée du pourcentage de spermatozoïdes morts et du pourcentage d'anomalies morphologiques.

Le but de notre étude était d'évaluer l'effet du dilueur et du colorant sur le pourcentage de spermatozoïdes morts et d'anomalies morphologiques lors de l'examen de la semence fraîche de taureau afin de proposer au praticien des outils adaptés aux conditions du terrain. La semence issue de taureaux producteurs de semence a été diluée avec de l'Optidyl® ou un tampon phosphate (PBS), puis colorée avec de l'éosine-nigrosine du commerce : Kit Vita Eosine (KVE) ou Sperm VitalStain (VitalStain). Les pourcentages de spermatozoïdes morts et d'anomalies morphologiques sont ensuite obtenus par lecture (200 spermatozoïdes par lames) au microscope optique de 2 lames par 2 opérateurs d'expérience différente (n=256).

Le couple KVE-PBS surestime significativement le pourcentage de spermatozoïdes morts par rapport aux autres couples. Cependant même si une dilution à l'Optidyl® semble donner des résultats plus satisfaisants, la lecture du couple PBS-VitalStain est beaucoup plus aisée et donc plus rapide, et pourrait contribuer à limiter les erreurs de lecture. Nous avons mis en évidence la présence artéfactuelle de queues repliées ou enroulées à l'extrémité lorsque les lames sont colorées au KVE. Pour les anomalies majeures et le reste des anomalies mineures, le dilueur et le colorant n'ont pas d'effet significatif. Nous n'avons pas mis en évidence d'effet de l'expérience du lecteur de lame.

Finalement, deux couples peuvent être utilisés sur le terrain : VitalStain-PBS si l'on recherche la facilité de lecture (confirmation de stérilité par exemple), et VitalStain-Optidyl si l'on recherche l'exactitude du résultat (dans le cas d'expertise par exemple).

MOTS-CLES : EVALUATION DE LA FONCTION REPRODUCTRICE DU TAUREAU, SEMENCE, ANOMALIES MORPHOLOGIQUES, VIABILITE, EOSINE-NIGROSINE, COLORATION, DILUEUR, OPTIDYL®

TITLE : STUDY OF THE EFFECT OF STAINING AND EXTENDER ON VIABILITY AND MORPHOLOGY OF FRESH BULL SPERMATOZOA

ABSTRACT : The morphology and the percentage of dead spermatozoa in fresh bull semen from natural service or insemination is linked to its fertility. One of the numerous staining methods is the eosin-nigrosine one, which permits to read simultaneously the percentage of dead spermatozoa and the percentage of morphological abnormalities.

The purpose of our study was to evaluate the effect of the staining and the extender on viability and morphology during fresh bull semen examination in order to propose effective and field-adapted tools to the practitioner.

Semen from insemination bulls has been extended with Optidyl® or a phosphate buffer saline solution (PBS) then stained with commercial eosin-nigrosine: Kit Vita Eosine (KVE) or Sperm VitalStain (VitalStain). Then, the proportion of dead spermatozoa and morphologically abnormal spermatozoa are obtained by bright field microscope reading of 2 slides (200 spermatozoa by slide) by 2 operators with different experience (n=256).

KVE-PBS couple significantly overestimate the percentage of dead spermatozoa with respect to others couples. However, even if an Optidyl® dilution seems to give more satisfying results, the reading of the PBS-VitalStain couple is much easier and so faster. We highlighted the artefactual presence of folded or wrapped tails at the ends when slides are stained with KVE. For major abnormalities and the others minor abnormalities, the extender and staining have no significant effect. We didn't evidence any effect of the slide reader experience.

Finally, two couples can be used in the field: VitalStain-PBS if we are looking for reading comfort (sterility confirmation for example), and VitalStain-Optidyl if we are looking for accurate results (expert assessment for example).

KEY WORDS : BULL BREEDING SOUNDNESS EVALUATION, SEMEN, SPERM MORPHOLOGY, SPERM VIABILITY, EOSIN-NIGROSIN, STAIN, EXTENDER, OPTIDYL®