



## 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 : 15997

**To cite this version :**

Decaudin, Adeline. *Comparaison de différentes méthodes de coloration de la semence bovine pour l'évaluation de la vitalité et des anomalies morphologiques des spermatozoides : coloration "Vita-Eosine", "Sperm VitalStain" et "Spermoscan"*. Thèse d'exercice, Médecine vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse - ENVT, 2016, 74 p.

Any correspondence concerning this service should be sent to the repository administrator: [staff-oatao@inp-toulouse.fr](mailto:staff-oatao@inp-toulouse.fr).

# COMPARAISON DE DIFFÉRENTES MÉTHODES DE COLORATION DE LA SEMENCE BOVINE POUR L'ÉVALUATION DE LA VITALITÉ ET DES ANOMALIES MORPHOLOGIQUES DES SPERMATOZOÏDES : COLORATIONS « *Vita- Eosine* », « *Sperm VitalStain* » ET « *Spermoscan* »

---

THESE  
pour obtenir le grade de  
DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

DIPLOME D'ÉTAT

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

*par*

**DECAUDIN Adeline**

Née, le 12 novembre 1991 à Chatenay-Malabry (92)

---

**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

MEMBRE INVITE :  
**Mme Patricia RONSIN**

Ingénieur d'Etude 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. **MILON Alain**, *Microbiologie moléculaire*
- 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. **SCHELCHER 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*
- Mme **CHASTANT-MAILLARD Sylvie**, *Pathologie de la Reproduction*
- 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*
- 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*
- Mme **BOULLIER Séverine**, *Immunologie générale et médicale*
- Mme **CADIERGUES Marie-Christine**, *Dermatologie*
- Mme **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*
- Mme **BIBBAL Delphine**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
- Mme **BOUHSIRA Emilie**, *Parasitologie, maladies parasitaires*
- M. **CONCHOU Fabrice**, *Imagerie médicale*
- M. **CORBIERE Fabien**, *Pathologie des ruminants*
- M. **CUEVAS RAMOS Gabriel**, *Chirurgie Equine*
- Mme **DANIELS Hélène**, *Microbiologie-Pathologie infectieuse*
- Mme **DEVIERS Alexandra**, *Anatomie-Imagerie*
- M. **DOUET Jean-Yves**, *Ophthalmologie vétérinaire et comparée*
- Mme **FERRAN Aude**, *Physiologie*
- M. **JAEG Jean-Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
- Mme **LACROUX Caroline**, *Anatomie Pathologique des animaux de rente*
- Mme **LAVOUE Rachel**, *Médecine Interne*
- M. **LE LOC'H Guillaume**, *Médecine zoologique et santé de la faune sauvage*
- 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)*
- Mme **PALIERNE Sophie**, *Chirurgie des animaux de compagnie*
- Mme **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 **WASET-SZKUTA Agnès**, *Production et pathologie porcine*

#### **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**

### **A 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.

### **A 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 sa grande disponibilité et son aide précieuse.  
Profonde gratitude.

### **A Madame le Professeur Nicole HAGEN-PICARD,**

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

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

### **A Madame le Docteur Patricia RONSIN,**

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

Pour ses conseils techniques, sa disponibilité et le temps consacré à la lecture des lames.  
Sincères remerciements.

**A Monsieur le Professeur Philippe JACQUIET,**

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse,  
*Parasitologie et Maladies Parasitaires,*

Pour l'organisation des manipulations de la thèse.

Sincères remerciements.

**A Monsieur Faouzi LYAZRHI,**

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

Pour son aide et sa patience.

Sincères remerciements.

**A l'ensemble de l'équipe du FRGDS-PACA et du GDS 04,**

Nicolas CORBOZ, Maxime MAROIS, Marceline PEGLION, Carine  
VILARDELL,

Pour l'accueil et l'organisation lors de la semaine de manipulation.

Sincères remerciements.

**A Monsieur Simon FLORENTIN,**

Pour son aide lors des manipulations.

Sincères remerciements.

**A Madame le Docteur Adriana ESTEBAN-GIL,**

Pour son implication dans ce travail.

Sincères remerciements.

**Aux élèves volontaires de la région PACA.**

# **Table des matières**

<b>Liste des abréviations</b> .....	10
<b>Table des illustrations</b> .....	11
1. Liste des Figures .....	11
2. Liste des Tableaux.....	11
3. Liste des Graphiques .....	13
4. Liste des Photographies .....	13
<b>INTRODUCTION</b> .....	15
<b><u>I. MATERIEL ET METHODE</u></b> .....	17
1. <u>Organisation de l'étude</u> .....	17
2. <u>La récolte de sperme</u> .....	18
3. <u>Examen de la semence</u> .....	19
a. Aspect macroscopique de l'éjaculat : volume, couleur et consistance .....	19
b. Concentration .....	20
c. Motilité massale.....	20
d. Motilité individuelle .....	20
4. <u>Réalisation des lames colorées</u> .....	21
a. Réalisation de la coloration Vita-Eosine®.....	22
b. Réalisation de la coloration Sperm VitalStain® .....	22
c. Réalisation de la coloration SpermSCAN®.....	23
5. <u>Lecture des étalements de sperme</u> .....	24
a. Mode de lecture.....	24
b. Évaluation du pourcentage de spermatozoïdes vivants et morts .....	24
c. Spermocytogramme .....	25
6. <u>Analyse statistique</u> .....	28

<b>II. RESULTATS</b> .....	29
1. <u>Appréciation des colorations par les opérateurs</u> .....	29
2. <u>Evaluation de la vitalité (pourcentage de spermatozoïdes morts)</u> .....	31
a. Relation entre l'opérateur, le dilueur et la coloration.....	31
b. Relation entre le pourcentage de spermatozoïdes vivants et la motilité individuelle .....	33
3. <u>Evaluation des anomalies morphologiques</u> .....	34
a. Relation entre l'opérateur et les anomalies morphologiques .....	34
b. Relation entre la dilution et les anomalies morphologiques.....	37
c. Relation entre la coloration et les anomalies morphologiques.....	39
<b>III. DISCUSSION</b> .....	43
1. <u>Discussion du matériel et méthode</u> .....	43
a. Choix des animaux utilisés .....	43
b. Choix de la méthode de collecte : l'électroéjaculateur.....	45
c. Choix du nombre de spermatozoïdes comptés .....	46
2. <u>Analyse et discussion des résultats</u> .....	46
a. Avantages et inconvénients de chaque coloration.....	46
b. Evaluation de la vitalité.....	47
c. Effet de l'opérateur sur les résultats du spermocytogramme.....	50
d. Effet des colorants sur les résultats du spermocytogramme .....	51
e. Effet du dilueur sur les résultats du spermocytogramme .....	53
3. <u>Limites et perspectives</u> .....	53
<b>CONCLUSION</b> .....	55
<b>Bibliographie</b> .....	57
<b>ANNEXES</b> .....	60
Annexe I : Valeurs de référence du spermogramme du taureau de monte naturelle.....	60

Annexe II : Données brutes du nombre de spermatozoïdes morts et d'anomalies morphologiques sur 200 spermatozoïdes comptés.....	61
Annexe III : Comparaison du pourcentage d'anomalies morphologiques selon le statut de l'opérateur et les colorations vitales (n = 23) .....	71
Annexe IV : Effet de la coloration sur le type d'anomalies de queue recensées.....	72
Annexe V : Effet de la dilution sur le type d'anomalies de queue recensées.....	73
Annexe VI : Etude de l'influence de la coloration sur le pourcentage d'anomalies morphologiques (opérateur expérimenté, semences non diluées).....	74

## **Liste des abréviations**

ANOVA : ANalysis Of VAriance

ENVT : Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

FRGDS-PACA : Fédération Régionale des Groupements de Défense Sanitaire de  
Provence-Alpes-Côte d'Azur

PACA : Provence-Alpes-Côte d'Azur

PI : Pièce Intermédiaire

# **Table des illustrations**

## **1. Liste des Figures**

Figure 1 : Etapes de la coloration Vita-Eosine® .....	22
Figure 2 : Etapes de la coloration Sperm VitalStain®.....	23
Figure 3 : Etapes de la coloration SpermSCAN® .....	23
Figure 4 : Anomalies morphologiques des spermatozoïdes selon la classification de Blom (1973), simplifiée par Ott (1986) et modifiée par Dumont (Dumont, 1997).....	26

## **2. Liste des Tableaux**

Tableau 1 : Races des taureaux de l'expérimentation .....	17
Tableau 2 : Critères de notation de la motilité massale .....	20
Tableau 3 : Paramètres d'étude de la vitalité chez le taureau X.....	25
Tableau 4 : Liste des anomalies de spermatozoïdes relevées selon leur localisation et la classification de Blom (1973).....	26
Tableau 5 : Appréciation des difficultés de lecture des frottis (n = 72) selon la coloration (Vita-Eosine®/Sperm VitalStain®/SpermSCAN®).....	29
Tableau 6 : Pourcentage de spermatozoïdes morts (moyenne ± écart-type) selon la coloration (Vita-Eosine®/Sperm VitalStain®), l'état de dilution (dilué/non dilué) et le statut de l'opérateur (expérimenté/novice).....	31
Tableau 7 : Pourcentage d'anomalies morphologiques (moyenne ± écart-type) selon le statut de l'opérateur (expérimenté/novice) et la coloration (Vita-Eosine®/Sperm VitalStain®/SpermSCAN®) (n = 18) .....	35
Tableau 8 : Pourcentage d'anomalies de la queue (moyenne ± écart-type) selon le type d'anomalies de la queue, le statut de l'opérateur (expérimenté/novice) et la coloration (Vita-Eosine®/Sperm VitalStain®/SpermSCAN®).....	36
Tableau 9 : Influence de l'état de dilution (dilué/non dilué) et de la coloration sur le pourcentage d'anomalies morphologiques (moyenne ± écart-type) (n = 18).....	37

Tableau 10 : Pourcentage d'anomalies morphologiques (moyenne $\pm$ écart-type) selon la coloration (Vita-Eosine®/Sperm VitalStain®/Spermoscan®).....	39
Tableau 11 : Pourcentage d'anomalies de la tête (moyenne $\pm$ écart-type) selon la coloration (Vita-Eosine®/Sperm VitalStain®/Spermoscan®).....	40
Tableau 12 : Pourcentage d'anomalies de la pièce intermédiaire (moyenne $\pm$ écart-type) selon la coloration (Vita-Eosine®/Sperm VitalStain®/Spermoscan®).....	40
Tableau 13 : Pourcentage d'anomalies de la queue (moyenne $\pm$ écart-type) selon la coloration (Vita-Eosine®/Sperm VitalStain®/Spermoscan®).....	41
Tableau 14 : Pourcentage d'anomalies majeures et mineures (moyenne $\pm$ écart-type) selon la coloration (Vita-Eosine®/Sperm VitalStain®/Spermoscan®) .....	42
Tableau 15 : Comparaison des avantages et inconvénients propres à chacune des colorations .....	47
Tableau 16 : Valeurs de référence du spermogramme du taureau de monte naturelle.....	60
Tableau 17 : Données brutes du nombre de spermatozoïdes morts sur 200 spermatozoïdes comptés et de la motilité individuelle (%) de chaque taureau (n = 23) en fonction de la coloration, de l'opérateur et de la dilution .....	61
Tableau 18 : Données brutes des relevés d'anomalies morphologiques dénombrées sur 200 spermatozoïdes .....	63
Tableau 19 : Pourcentage d'anomalies morphologiques (moyenne $\pm$ écart-type) selon le statut de l'opérateur (expérimenté/novice) et la coloration vitale (Vita-Eosine®/Sperm VitalStain®) (n = 23).....	71
Tableau 20 : Influence de l'état de dilution (dilué/non dilué) et de la coloration vitale sur le pourcentage d'anomalies morphologiques (moyenne $\pm$ écart-type) (n = 23) ...	71
Tableau 21 : Comparaison du pourcentage d'anomalies de queue (moyenne $\pm$ écart-type) selon l'état de dilution (dilué/non dilué).....	73

### 3. Liste des Graphiques

Graphique 1 : Proportion de spermatozoïdes morts selon la coloration (Vita-Eosine®/Sperm VitalStain®), le statut de l'opérateur (novice/expérimenté) et l'état de dilution (dilué/non dilué).....	33
Graphiques 2 et 3 : Représentation des pourcentages de spermatozoïdes vivants obtenus avec la coloration Vita-Eosine® (Graphique 2) et Sperm VitalStain® (Graphique 3) en fonction de la motilité individuelle de chaque échantillon de semence (n = 23).....	34
Graphique 4 : Influence de la dilution sur la fréquence des différentes anomalies (Tête/Pièce Intermédiaire (PI)/Queue) en fonction de la coloration (Vita-Eosine®/Sperm VitalStain®/Spermoscan®).....	38
Graphique 5 : Pourcentage d'anomalies de queue selon le type d'anomalies (queue : repliée/enroulée proximale/ enroulée distale/courte) et selon la coloration (Vita-Eosine®/Sperm VitalStain®/Spermoscan®) .....	72
Graphique 6 : Pourcentage d'anomalies selon leur localisation (Tête/Pièce intermédiaire (PI)/Queue) et selon la coloration (Vita-Eosine®/Sperm VitalStain®/Spermoscan®).....	74
Graphique 7 : Pourcentage d'anomalies selon la classification de Blom (anomalies majeures/mineures) et selon la coloration (Vita-Eosine®/Sperm VitalStain®/Spermoscan®).....	74

### 4. Liste des Photographies

Photographie 1 : Sonde rectale Electrojac5® avec 3 électrodes longitudinales .....	18
Photographie 2 : Organisation de la paillasse du laboratoire.....	19
Photographie 3 : Spermatozoïde mort coloré en rose et spermatozoïde vivant non coloré (blanc) (Vita-Eosine®).....	25
Photographie 4 : Tête de spermatozoïde seule et piriforme .....	27
Photographie 5 : Spermatozoïde avec tête déformée .....	27
Photographie 6 : Gouttelette proximale présente sur la pièce intermédiaire.....	27
Photographie 7 : Deux spermatozoïdes avec une pièce intermédiaire déformée .....	27

Photographie 8 : Deux spermatozoïdes présentant un flagelle enroulé distalement	27
Photographie 9 : Spermatozoïde avec flagelle enroulé proximale.....	27
Photographie 10 : Bulles présentes sur une lame colorée avec Sperm VitalStain®.	29
Photographie 11 : Comparaison de l'évaluation de la pièce intermédiaire avec les trois colorations (Spermoscan®/Vita-Eosine®/Sperm VitalStain®) .....	30
Photographies 12 et 13 : Comparaison de l'évaluation de la vitalité des spermatozoïdes avec le kit Vita-Eosine® (à gauche) et le kit Sperm VitalStain® (à droite) .....	31

## INTRODUCTION

En France, la monte naturelle est le mode de reproduction le plus répandu en élevage bovin allaitant. Ainsi, en 2011, 85% des veaux de races allaitantes étaient issus de saillies et seulement 15 % d'inséminations artificielles (Alteroche, 2013). En cas de trouble de la fertilité dans ces élevages, il est intéressant d'avoir une méthode rapide et peu coûteuse pour évaluer la qualité de la semence du taureau reproducteur. Ainsi, l'évaluation de la qualité de la semence est possible par la réalisation d'un spermogramme. Le terme « spermogramme » regroupe différentes méthodes d'évaluation du sperme dont l'examen de la vitalité et des anomalies morphologiques des spermatozoïdes. Ces deux examens sont réalisables grâce à des frottis colorés de sperme. Ceci permet de mettre en évidence des troubles de la spermatogénèse et d'évaluer la qualité du sperme.

De nombreuses méthodes de coloration de sperme existent dont la plus couramment utilisée est la coloration dite « vitale » à base d'éosine et de nigrosine. Cette coloration peut se présenter sous différentes formes, soit en réactifs dissociés tel le kit Vita-Eosine® (réactifs RAL, Martillac), soit avec les réactifs directement associés entre eux tel le kit Sperm VitalStain® (Nidacon, Suède). Les « colorations vitales » permettent l'évaluation de la vitalité par l'évaluation de l'intégrité membranaire. Les colorants vitaux pénètrent la membrane altérée des spermatozoïdes morts. Les cellules capables de rejeter ces colorants sont alors considérées comme vivantes. Une autre catégorie de méthodes de coloration comprend les colorations dites « totales » qui ont pour but de mettre en évidence les anomalies morphologiques. Ces colorations totales peuvent être simples ou doubles. La coloration totale double permet en plus de mettre en évidence l'acrosome. Un exemple de coloration totale double est le kit SpermScan® (réactifs RAL, Martillac).

Les trois types de formulation de colorants cités (Vita- Eosine®, Sperm VitalStain®, SpermScan®) n'ont pas été comparés chez les bovins. De ce fait, il n'est pas possible de savoir si ces trois colorants peuvent être utilisés indifféremment.

La présente étude a pour but de comparer trois méthodes de coloration du sperme disponibles pour l'évaluation de la vitalité et des anomalies morphologiques des spermatozoïdes : deux colorations commerciales à base d'éosine-nigrosine (Vita-Eosine® et Sperm VitalStain®) et une coloration commerciale à base d'éosine et de bleu de méthylène (Spermoscan®).

La semence a été prélevée dans le cadre d'une étude sur l'impact de la besnoitiose sur la fertilité de taureaux reproducteurs et la qualité de la semence. Les résultats de cette étude sont présentés dans la thèse de doctorat vétérinaire de Simon FLORENTIN intitulée « La semence de taureaux infectés par *Besnoitia besnoiti* : moindre qualité et source de contamination ? ».

## I. MATERIEL ET METHODE

### 1. Organisation de l'étude

La récolte des échantillons et des données s'est déroulée du 9 au 12 septembre 2013 au Centre de monte mulassier et équin de Seyne-les-Alpes, dans le département des Alpes-de-Haute-Provence (04). Les participants de l'étude sont la Fédération Régionale des Groupements de Défense Sanitaire de la région Provence-Alpes-Côte d'Azur (FRGDS PACA), l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse (ENVT) et les éleveurs de la région PACA.

Au total, 43 taureaux de races allaitantes âgés de 1,5 à 8,5 ans (moyenne  $\pm$  écart-type :  $3,8 \pm 1,9$  ans) pratiquant la monte naturelle ont été présentés par des éleveurs volontaires (Tableau 1). Sur ces 43 taureaux, 2 taureaux limousins n'ont pas été prélevés pour raison de sécurité et un éleveur a refusé le prélèvement de son taureau blond d'Aquitaine. Sur les 40 taureaux restants, quatre n'ont pas pu être prélevés en raison de défauts de réponse à l'électroéjaculateur.

Sur les 36 taureaux prélevés lors de l'expérimentation, 29 taureaux présentaient une sérologie positive à la besnoitiose dont 12 présentaient des signes cliniques. Les 8 autres taureaux étaient séronégatifs.

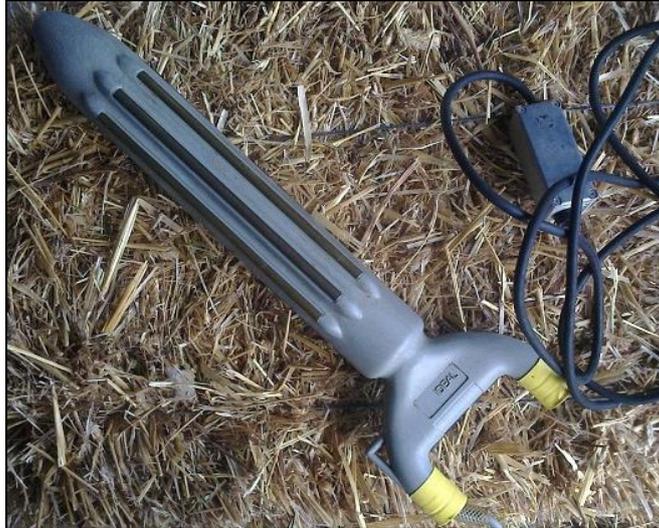
Tableau 1 : Races des taureaux de l'expérimentation

Race	Charolais	Limousin	Blond d'Aquitaine	Abondance	Angus	Total
Nombre de taureaux à prélever	21	18	2	1	1	43
Nombre de taureaux prélevés	18	16	1	1	0	36

La contention de ces taureaux a été possible par l'utilisation d'une cage de contention permettant un accès aisé à l'appareil génital du taureau.

## 2. La récolte de sperme

La récolte de la semence a été réalisée à l'aide d'un électro-éjaculateur. Une sonde rectale Electrojac5® (Ideal® Instruments, MI, USA) a été utilisée (Photographie 1).



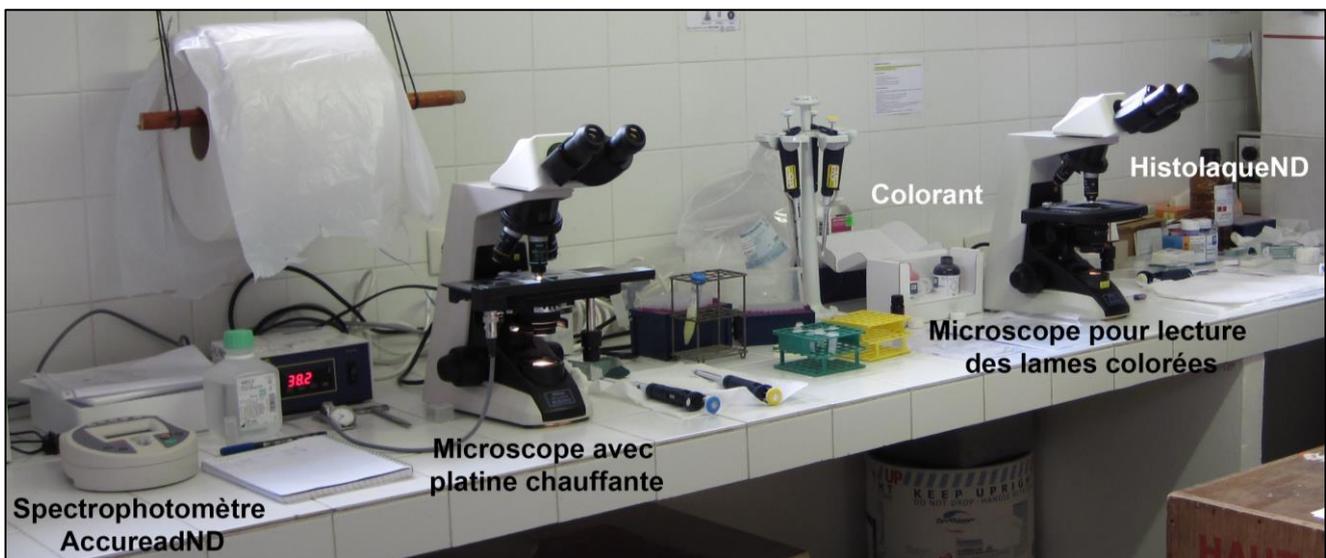
Photographie 1 : Sonde rectale Electrojac5® avec 3 électrodes longitudinales

Les étapes successives de la collecte ont débuté par un nettoyage soigneux de la région préputiale du taureau à l'aide d'un savon antiseptique iodé (Vétédine savon<sup>ND</sup>, Vétuquinol, Lure), suivi d'un rinçage abondant à l'eau claire et d'un séchage au papier jetable. Simultanément, un deuxième opérateur massait, par voie transrectale, les glandes annexes dans le but de stimuler les sécrétions préspermatiques.

Après avoir préalablement vidé le rectum, la sonde transrectale était introduite dans le rectum (électrodes dirigées ventralement) et l'intensité de la stimulation électrique était progressivement augmentée manuellement jusqu'à obtenir l'éjaculation. L'éjaculat a été récupéré dans un tube de collecte de type Falcon<sup>ND</sup> grâce à un cône de prélèvement. Le tube a été maintenu à la température de 37°C et a été directement transféré au laboratoire, adjacent au hangar de collecte.

### 3. Examen de la semence

L'examen de la semence a été réalisé immédiatement après la récolte par deux opérateurs expérimentés dans le laboratoire adjacent (Photographie 2). Ces deux opérateurs se sont mis en accord pour les différentes mesures. Les différentes étapes de cet examen ont été décrites par Dumont (1997). Les résultats de spermogramme attendus chez un taureau de monte naturelle sont présentés dans le Tableau 16 (Annexe I).



Photographie 2 : Organisation de la paillasse du laboratoire

Les données obtenues lors de cet examen ont été analysées dans la thèse de Simon FLORENTIN (« La semence de taureaux infectés par *Besnoitia besnoiti* : moindre qualité et source de contamination ? »).

#### a. Aspect macroscopique de l'éjaculat : volume, couleur et consistance

Directement après prélèvement, le volume de l'éjaculat a été mesuré par lecture des graduations du tube collecteur (type Falcon<sup>ND</sup>). Simultanément, la couleur et la consistance ont été appréciées.

## b. Concentration

L'évaluation de la concentration a été réalisée par spectrophotométrie (Accuread, IMV, L'Aigle) selon les recommandations du fabricant.

## c. Motilité massale

Directement après le prélèvement de la semence, une goutte de sperme a été déposée à la surface d'une lame préalablement chauffée à 37°C. La goutte a été observée sous microscope au grossissement x100.

La motilité est notée sur une échelle allant de 0 à 5. Les critères de notations sont explicités dans le Tableau 2.

Tableau 2 : Critères de notation de la motilité massale

Note	Observations
0	Immobilité
1	Léger mouvement, absence de vagues
2	Vagues peu nombreuses
3	Vagues nombreuses
4	Vagues rapides et intenses
5	Tourbillons très rapides

## d. Motilité individuelle

L'évaluation de la motilité individuelle a été réalisée par observation, au microscope à contraste de phase, d'une goutte de sperme entre lame et lamelle, préalablement chauffées à 37°C, au grossissement x100.

La lecture a été réalisée après dilution du sperme avec le dilueur, à base de lécithine de soja, Bioxcell® (IMV technologies, L'Aigle) maintenu à 37°C. La dilution a pour but de permettre d'individualiser chaque spermatozoïde en mouvement.

L'évaluation de la motilité individuelle consiste en l'estimation du pourcentage de spermatozoïdes mobiles par rapport au nombre de spermatozoïdes totaux. Les spermatozoïdes effectuant des mouvements sur place, tournant en petits cercles ou se déplaçant en arrière du fait d'une queue repliée ne sont pas comptabilisés comme mobile.

#### 4. Réalisation des lames colorées

Dans un même temps étaient réalisées les lames permettant l'évaluation des pourcentages de spermatozoïdes morts et de spermatozoïdes présentant des anomalies morphologiques. Cette opération a été effectuée par deux opérateurs : un opérateur n'ayant jamais réalisé de spermogramme, qualifié de novice, et un opérateur réalisant régulièrement des spermogrammes depuis plusieurs années, qualifié d'expérimenté.

Chaque éjaculat a été analysé à l'aide de trois kits de coloration différents : le kit Vita-Eosine®, le kit Sperm VitalStain® et le kit SpermSCAN®. Chaque coloration a été doublée. Les deux opérateurs réalisaient chacun un jeu de lame.

Au début de l'expérimentation, les éjaculats fortement concentrés ont été dilués avec le dilueur Bioxcell® maintenu à la température de 37°C. La dilution a pour but de faciliter la lecture ultérieure en permettant d'individualiser plus facilement les spermatozoïdes (diminution du nombre de spermatozoïdes sur un champ du microscope). Suite à l'observation directe de la faible vitalité des spermatozoïdes de ces quelques lames, il a été décidé de réaliser d'une part un jeu de frottis avec du sperme dilué, et d'autre part, un jeu de frottis avec du sperme non dilué afin d'évaluer l'effet du dilueur sur la vitalité. Chaque échantillon de semence de taureau a fait l'objet de 6 étalements (3 dilués et 3 non dilués).

Chaque frottis a été mis à sécher plusieurs heures à l'air libre, à température ambiante. Suite à ce séchage, les lames ont été lutées à l'aide d'Histolaque LMR® (Labomoderne, Paris), laque transparente à séchage rapide. Ceci a permis une lecture différée dans le temps des lames sans altération de la qualité de la coloration.

#### a. Réalisation de la coloration Vita-Eosine®

Le kit Vita-Eosine® comporte une solution d'éosine concentrée à 2 % et une solution de nigrosine concentrée à 2 %. Pour la réalisation des lames colorées avec le kit Vita-Eosine®, 50 µL de sperme et 50 µL de solution d'éosine ont été mélangés dans un tube Eppendorf puis agités 30 secondes. À ce mélange, il a été ajouté 100 µL de solution de nigrosine. Ce type de méthode peut être considéré comme une coloration à l'éosine-nigrosine en deux étapes (cf. Figure 1).

Le frottis a été réalisé en étalant une goutte du mélange sur une lame à l'aide d'une lame rodée inclinée à 45°.

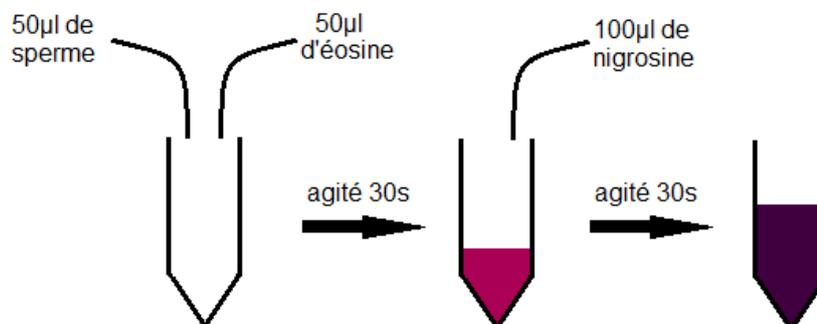


Figure 1 : Etapes de la coloration Vita-Eosine®

#### b. Réalisation de la coloration Sperm VitalStain®

Le kit Sperm VitalStain® comporte un unique flacon de colorant constitué de 0,67 % d'éosine Y et de 10 % de nigrosine dilués avec du sodium chloride à 0,9 %. Pour la réalisation des lames colorées avec le kit Sperm VitalStain®, 50 µL de sperme et 50 µL de VitalStain ont été mélangés dans un tube Eppendorf. Après avoir agité le tube,

le mélange a été mis à incuber 30 secondes, à température ambiante. Ce type de méthode peut être considéré comme une coloration à l'éosine-nigrosine en une étape (cf. Figure 2).

Le frottis a été réalisé en étalant une goutte du mélange sur une lame à l'aide d'une lame rodée inclinée à 45°.

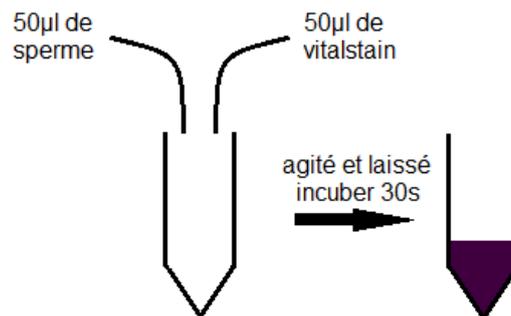


Figure 2 : Etapes de la coloration Sperm VitalStain®

### c. Réalisation de la coloration SpermScan®

Un frottis a été réalisé avec une goutte de sperme déposée sur une lame et étalée à l'aide d'une lame rodée inclinée à 45°. Ce frottis a été plongé 1 minute dans le flacon contenant le fixateur (méthanol), puis 10 fois 1 seconde dans le flacon contenant de l'éosine Y et, pour finir, 10 fois 1 seconde dans le flacon contenant du bleu de méthylène. Entre chaque étape, la lame est égouttée pour ôter l'excédent de solutions (Figure 3).

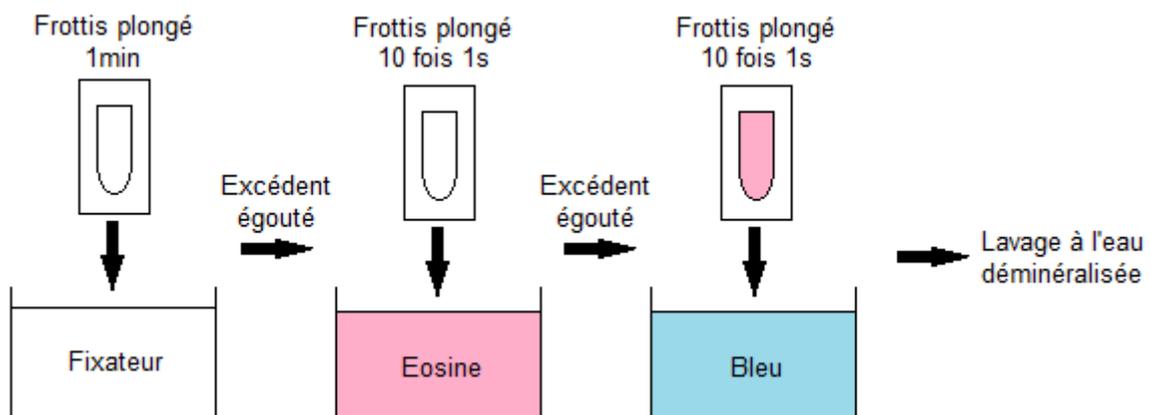


Figure 3 : Etapes de la coloration SpermScan®

Le kit SpermScan® colore le noyau en violet, l'acrosome en rose, le flagelle en rose pâle et la pièce intermédiaire en rose violacée.

## 5. Lecture des étalements de sperme

### a. Mode de lecture

Chaque lame a été lue par deux opérateurs (le novice et l'expérimenté). La lecture a porté sur 200 spermatozoïdes selon les recommandations fournies par le fabricant. Elle a été réalisée à l'aide d'un microscope optique, au grossissement x1000 (oculaire 10 et objectif 100), à l'immersion. Les lames ont été lues de manière aléatoire, aucun échange des résultats obtenus lors des lectures ne se faisant entre les opérateurs avant la fin de la lecture de l'ensemble des lames.

En tout, chaque opérateur a lu 216 lames (36 taureaux x 3 colorations x 2 dilutions).

### b. Évaluation du pourcentage de spermatozoïdes vivants et morts

Cette évaluation a été réalisée avec les colorations vitales Vita-Eosine® et Sperm VitalStain®. Les spermatozoïdes morts présentent une coloration rose (Photographie 3). Il est spécifié qu'avec la coloration Sperm VitalStain®, les spermatozoïdes colorés seulement au niveau de la pièce intermédiaire sont vivants. Les spermatozoïdes morts présentent une tête de couleur rose.

Un sperme de taureau allaitant est considéré insatisfaisant lorsqu'il présente plus de 40 % de spermatozoïdes morts (Hopkins et Spitzer, 1997).



Photographie 3 : Spermatozoïde mort coloré en rose et spermatozoïde vivant non coloré (blanc) (Vita-Eosine®)

Le Tableau 3 présente les paramètres comparés pour chaque taureau.

Tableau 3 : Paramètres d'étude de la vitalité chez le taureau X

Taureau	X							
Colorant	Vita-Eosine®				Sperm VitalStain®			
Dilution	non		oui		non		oui	
<b>Lecteur :</b> 1 = expérimenté 2 = novice	1	2	1	2	1	2	1	2
<b>Spermatozoïdes morts (%)</b>								

### c. Spermocytogramme

Pour les trois colorations, un spermocytogramme a été réalisé. Les anomalies morphologiques ont été relevées selon la classification de Dumont (1997) (Figure 4). Ces anomalies sont divisées en anomalies majeures et mineures en accord avec la classification de Blom (1973). La dichotomie en anomalies majeures/mineures permet de classer les anomalies selon leur importance dans le potentiel de reproduction.

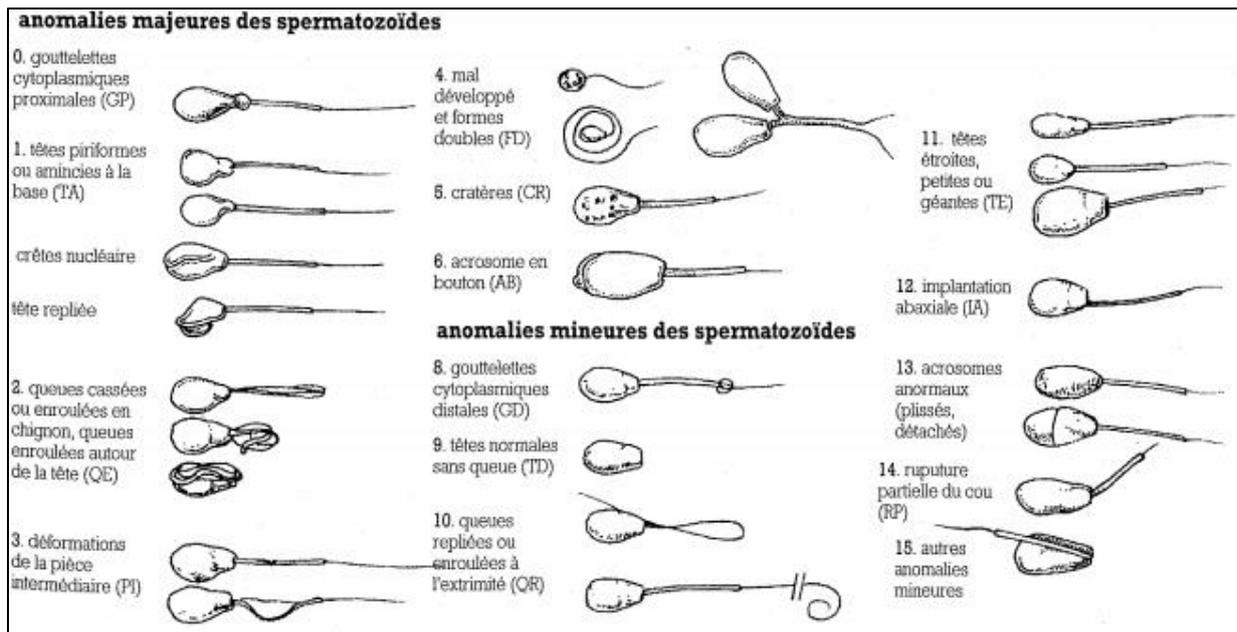
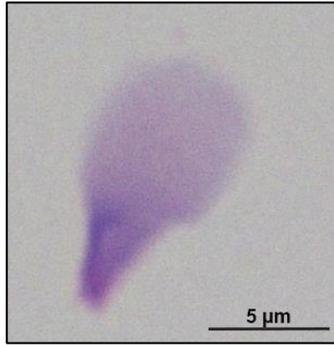


Figure 4 : Anomalies morphologiques des spermatozoïdes selon la classification de Blom (1973), simplifiée par Ott (1986) et modifiée par Dumont (Dumont, 1997)

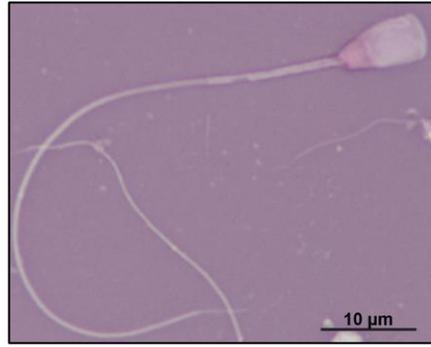
Le Tableau 4 liste les anomalies morphologiques relevées lors de la lecture des lames selon leur localisation (tête/pièce intermédiaire/queue) et leur importance dans le potentiel de reproduction (majeures/mineures).

Tableau 4 : Liste des anomalies de spermatozoïdes relevées selon leur localisation et la classification de Blom (1973)

Localisation	Anomalies majeures	Anomalies mineures
<b>Tête</b>	Piriforme (Photographie 4) Déformée (Photographie 5)	Seule (Photographie 4) Repliée
<b>Pièce intermédiaire</b>	Gouttelette proximale (Photographie 6) Déformée (Photographie 7) rupture pièce	Gouttelette distale
<b>Queue</b>	Enroulée proximale (Photographie 9)	Enroulée distalement (Photographie 8) queue courte/cassée queue repliée



Photographie 4 : Tête de spermatozoïde  
seule et piriforme  
(Spermoscan®)



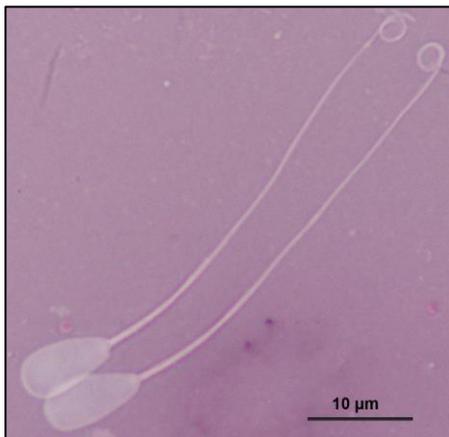
Photographie 5 : Spermatozoïde avec  
tête déformée  
(Sperm VitalStain®)



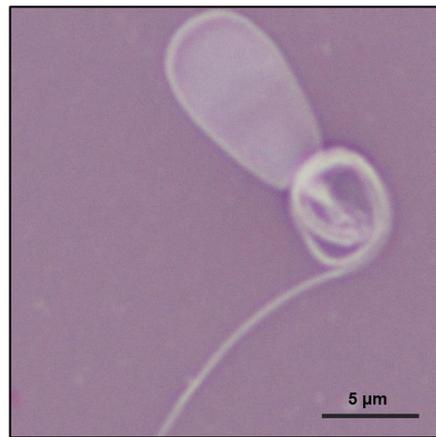
Photographie 6 : Gouttelette proximale  
présente sur la pièce intermédiaire  
(Sperm VitalStain®)



Photographie 7 : Deux spermatozoïdes  
avec une pièce intermédiaire déformée  
(Sperm VitalStain®)



Photographie 8 : Deux spermatozoïdes  
présentant un flagelle enroulé distalement  
(Vita-Eosine®)



Photographie 9 : Spermatozoïde avec  
flagelle enroulé proximale  
(Vita-Eosine®)

Lorsque deux anomalies étaient présentes sur le même spermatozoïde, seule l'anomalie majeure était comptabilisée (Exemple : sur la Photographie 2, la tête est seule et piriforme : seule l'anomalie piriforme est comptabilisée). Néanmoins si deux anomalies majeures étaient présentes sur le même spermatozoïde, l'anomalie de la tête était comptabilisée.

Un sperme de taureau de race allaitante est considéré insatisfaisant lorsque le pourcentage d'anomalies morphologiques des spermatozoïdes dépasse 30 % ou que le pourcentage d'anomalies de la tête est supérieur à 20 % (Hopkins et Spitzer, 1997).

## 6. Analyse statistique

L'analyse statistique s'est faite selon une analyse de variance (ANOVA) grâce au logiciel R. Le seuil de 5 % ( $p \leq 0,05$ ) a été retenu comme significatif.

Modèle :  $Y_{i,j,k,l} = \mu + T_i + C_j + O_k + D_l + C_j*O_k + C_j*D_l + C_j*D_l*O_k + \varepsilon$

Avec :

$T_i = i^{\text{ème}}$  taureau, avec  $i = [1:36]$  ;

$C_j = j^{\text{ème}}$  coloration, avec  $j = [1:3]$  ;

$O_k = k^{\text{ème}}$  opérateur, avec  $k = [1:2]$  ;

$D_l = l^{\text{ème}}$  dilution, avec  $l = [0:1]$

## II. RESULTATS

Les données brutes sont exposées dans les Tableaux 17 et 18 en Annexe II.

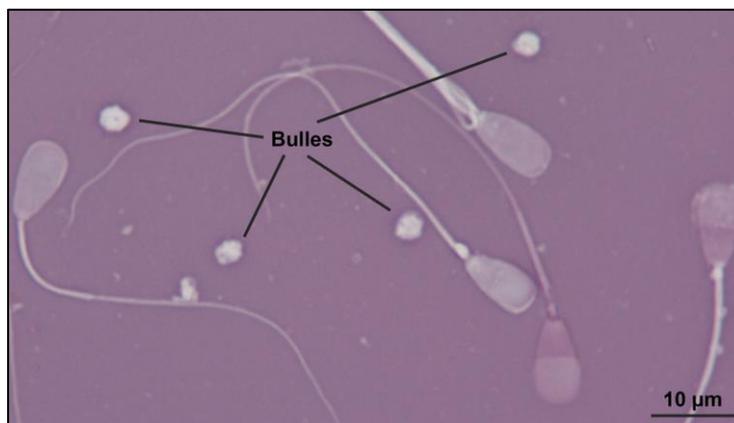
### 1. Appréciation des colorations par les opérateurs

Le Tableau 5 présente les différentes difficultés auxquelles les opérateurs ont été confrontés en fonction de la coloration (Vita-Eosine®, Sperm VitalStain® et Spermoscan®). Les résultats se basent sur les 72 frottis réalisés pour chacune de ces colorations (2 frottis par taureau : 1 frottis dilué et 1 frottis non dilué).

Tableau 5 : Appréciation des difficultés de lecture des frottis (n = 72) selon la coloration (Vita-Eosine®/Sperm VitalStain®/Spermoscan®)

	Bulles	Frottis pâles	Frottis très pâles	Frottis illisible
<b>Vita-Eosine®</b>	8 (11,0 %)	1 (1,4 %)	0 (0 %)	0 (0 %)
<b>Sperm VitalStain®</b>	1 (1,4 %)	3 (4,2 %)	1 (1,4 %)	0 (0 %)
<b>Spermoscan®</b>	0 (0 %)	9 (12,5 %)	2 (2,8 %)	5 (6,9 %)

Des « bulles » sont présentes sur 11,0 % des frottis réalisés avec Vita-Eosine® et sur 1,4 % des frottis réalisés avec Sperm VitalStain® (Photographie 10). Ces « bulles » sont considérées comme un artéfact dû à un mauvais dégraissage de certaines lames. Elles ne sont visibles qu'en présence d'une coloration de fond.



Photographie 10 : « Bulles » présentes sur une lame colorée avec Sperm VitalStain®

La coloration SpermScan® présente une plus grande difficulté de lecture avec 12,5 % de frottis pâles et 2,8 % de frottis très pâles. Elle est la seule coloration présentant des lames non lisibles (6,9 %) dues à un défaut de coloration.

La coloration Sperm VitalStain® présente 5,6 % de lames difficiles à lire (3 pâles et 1 très pâle) et la coloration Vita-Eosine® a 1,4 % de frottis pâles.

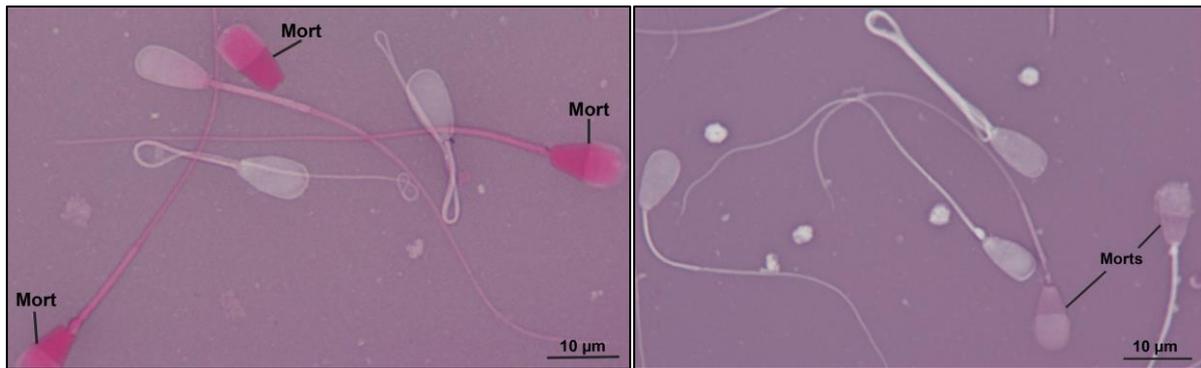
La morphologie de la pièce intermédiaire est plus difficilement appréciable avec la coloration SpermScan® en comparaison des deux autres colorations (Photographie 11). La coloration segmentaire (noyau, acrosome, pièce intermédiaire, queue) de ce colorant n'est pas aisée.



Photographie 11 : Comparaison de l'évaluation de la pièce intermédiaire avec les 3 colorations (SpermScan®/Vita-Eosine®/Sperm VitalStain®)

Pour les colorations vitales (Vita-Eosine® et Sperm VitalStain®), l'appréciation de la vitalité a été considérée comme plus difficile avec la coloration Sperm VitalStain® (Photographies 12 et 13).

Sur la Photographie 12 (Vita-Eosine®), trois spermatozoïdes sont morts sur les six observables contre deux spermatozoïdes morts sur cinq sur la Photographie 13 (Sperm VitalStain®).



Photographies 12 et 13 : Comparaison de l'évaluation de la vitalité des spermatozoïdes avec le kit Vita-Eosine® (à gauche) et le kit Sperm VitalStain® (à droite)

## 2. Evaluation de la vitalité (pourcentage de spermatozoïdes morts)

### a. Relation entre l'opérateur, le dilueur et la coloration

Les données utilisées proviennent des 23 taureaux pour lesquels nous disposons de lames colorées de semence diluée et non diluée. Avec ces données, une interaction d'échelon 2 entre l'opérateur, la coloration et la dilution est donnée significative avec  $p = 0,006$  (ANOVA).

Tableau 6 : Pourcentage de spermatozoïdes morts (moyenne  $\pm$  écart-type) selon la coloration (Vita-Eosine®/Sperm VitalStain®), l'état de dilution (dilué/non dilué) et le statut de l'opérateur (expérimenté/novice)

Pourcentage de spermatozoïdes morts	Vita-Eosine®	Sperm VitalStain®
<b>Opérateur expérimenté</b>		
Semence non diluée	76,3 <sup>a, A</sup> $\pm$ 19,7	39,9 <sup>b, A</sup> $\pm$ 24,3
Semence diluée	94,0 <sup>a, B</sup> $\pm$ 11,9	89,3 <sup>a, B</sup> $\pm$ 25,0
<b>Opérateur novice</b>		
Semence non diluée	67,0 <sup>a, A</sup> $\pm$ 15,5	43,2 <sup>b, A</sup> $\pm$ 23,6
Semence diluée	90,3 <sup>a, B</sup> $\pm$ 16,7	53,6 <sup>b, B</sup> $\pm$ 19,0

<sup>a, b</sup> : les valeurs avec des exposants différents sur la même ligne sont significativement différentes ( $p < 0,05$  ; ANOVA) ; <sup>A, B</sup> : pour chaque opérateur, les valeurs avec des exposants différents dans la même colonne sont significativement différentes ( $p < 0,05$  ; ANOVA)

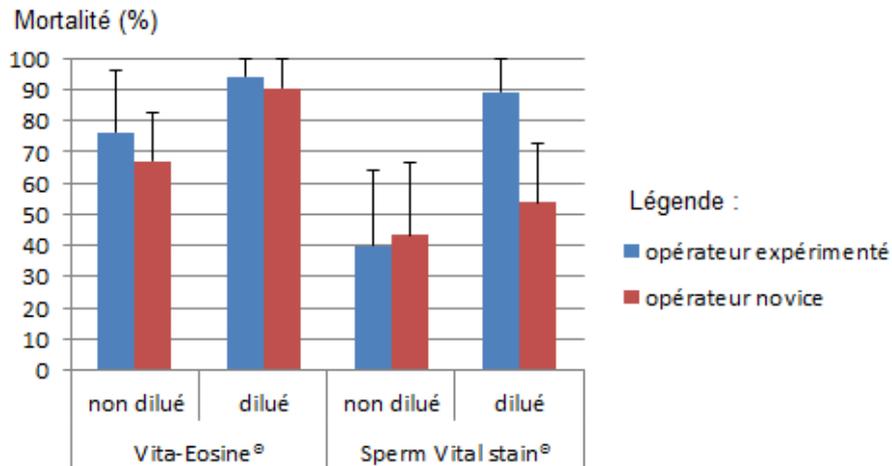
**Lorsque la semence n'est pas diluée**, l'opérateur expérimenté comptabilise en moyenne ( $\pm$  écart-type)  $76,3 \pm 19,7$  % de spermatozoïdes morts avec Vita-Eosine® et  $39,9 \pm 24,3$  % de spermatozoïdes morts avec le Sperm VitalStain®. L'opérateur novice observe également une mortalité plus élevée avec la coloration Vita-Eosine® ( $67,0 \pm 15,5$  % de spermatozoïdes morts) qu'avec la coloration Sperm VitalStain® ( $43,2 \pm 23,6$  % de spermatozoïdes morts). Cette différence de mortalité entre les deux colorations sur la semence non diluée est significative ( $p < 0,001$ ) pour les deux opérateurs. **La coloration Vita-Eosine® est associée à une mortalité plus élevée que la coloration Sperm VitalStain®.**

**Lorsque la semence est diluée** avec le dilueur Bioxcell®, le nombre de spermatozoïdes morts comptés par l'opérateur expérimenté s'élève à  $94,0 \pm 11,9$  % et à  $89,3 \pm 25,0$  % avec respectivement la coloration Vita-Eosine® et la coloration Sperm VitalStain®. Cette élévation de la mortalité sur les frottis colorés lorsque la semence est diluée par rapport à de la semence non diluée est significative pour les deux colorations ( $p < 0,01$  pour Vita-Eosine® et  $p < 0,001$  pour Sperm VitalStain®). La différence de 5 % ( $94,0 \pm 11,9$  % vs  $89,3 \pm 25,0$  %) obtenue entre les deux colorants avec la dilution n'est pas significative ( $p = 0,2$ ). **Quelle que soit la coloration, la dilution de la semence à l'aide du Bioxcell® est associée à un nombre de spermatozoïdes colorés plus élevé qu'en l'absence de dilution.**

Les résultats obtenus avec la **coloration Vita-Eosine®** par les deux opérateurs (Tableau 6) ne présentent pas de différences significatives ( $p = 0,09$ ) que la semence soit diluée ou non. **La coloration Vita-Eosine® n'entraîne pas de variation entre les opérateurs dans l'évaluation de la vitalité.**

Avec de la **semence non diluée**, les moyennes ( $\pm$  écart-type) obtenues par les deux opérateurs avec la coloration Sperm VitalStain® ( $39,9 \pm 24,3$  % vs  $43,2 \pm 23,6$  %) ne présentent pas de différences significatives ( $p = 0,3$ ).

En ce qui concerne la **semence diluée colorée avec le kit Sperm VitalStain®**, l'opérateur expérimenté indique une mortalité de  $89,3 \pm 25,0$  % alors que l'opérateur novice indique  $53,6 \pm 19,0$  % (Graphique 1). Les résultats diffèrent significativement entre les opérateurs avec la semence diluée ( $p < 0,001$ ). Il est à noter que l'opérateur novice obtient des résultats aux alentours de 50 % que la semence soit diluée ou non avec cette coloration.

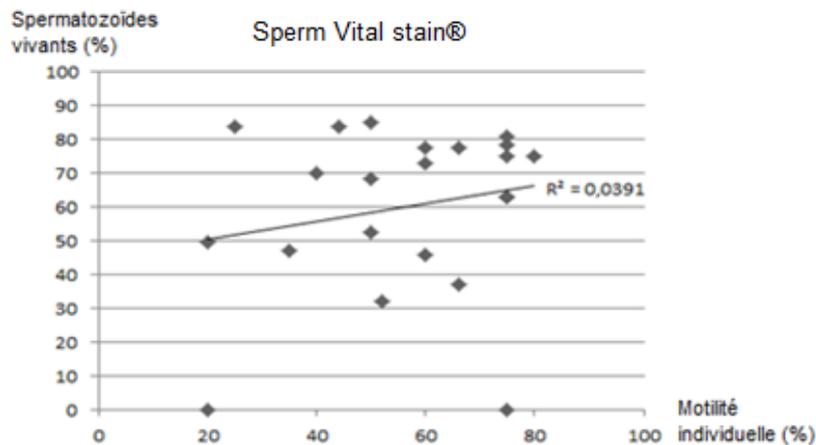
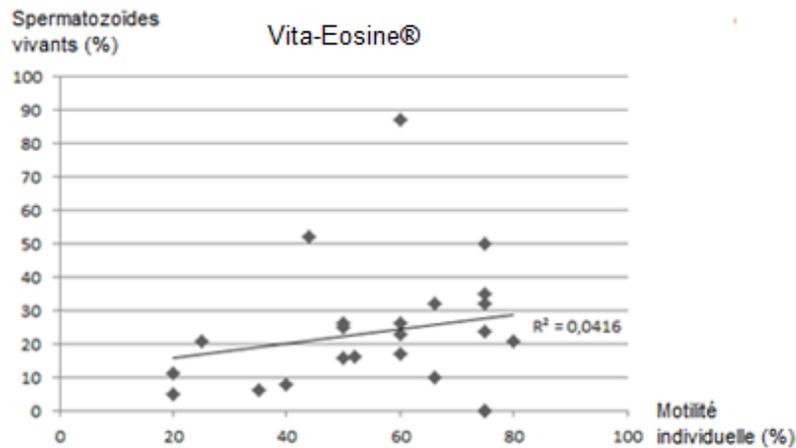


Graphique 1 : Proportion de spermatozoïdes morts selon la coloration (Vita-Eosine®/Sperm VitalStain®), le statut de l'opérateur (novice/expérimenté) et l'état de dilution (dilué/non dilué)

b. Relation entre le pourcentage de spermatozoïdes vivants et la motilité individuelle

Au vu des résultats obtenus dans la partie II.2.a, seules les données de l'opérateur expérimenté obtenues avec de la semence non diluée (mortalité plus faible) sont utilisées pour étudier la relation entre le pourcentage de spermatozoïdes vivants et la motilité individuelle avec les colorations Vita-Eosine® et Sperm VitalStain®.

L'analyse par régression linéaire (Graphique 2 et 3) ne montre **pas de relation entre le pourcentage de spermatozoïdes vivants et la motilité individuelle du sperme des taureaux, quelle que soit la coloration ( $r^2 = 0,04$ )**. Ainsi, sur des lames réalisées à partir de semence présentant une motilité individuelle de 75 %, aucun spermatozoïde vivant n'a pu être observé.



Graphique 2 et 3 : Représentation des pourcentages de spermatozoïdes vivants obtenus avec la coloration Vita-Eosine® (Graphique 2) et Sperm VitalStain® (Graphique 3) en fonction de la motilité individuelle de chaque échantillon de semence (n = 23)

### 3. Evaluation des anomalies morphologiques

#### a. Relation entre l'opérateur et les anomalies morphologiques

Pour l'évaluation des anomalies morphologiques, seuls 18 taureaux peuvent être utilisés dans l'analyse statistique ANOVA. Il s'agit des 23 taureaux utilisés pour l'analyse de la vitalité auxquels sont ôtés les 5 taureaux dont une lame colorée avec le SpermScan® est illisible. L'analyse statistique sur ces 18 jeux de lames montre une interaction entre l'opérateur et la coloration ( $p = 0,002$ ). Il en est de même si seules les 23 lames Vita-Eosine® et Sperm VitalStain® sont comparées ( $p = 0,01$ ) (Tableau 19, Annexe III).

Tableau 7 : Pourcentage d'anomalies morphologiques (moyenne  $\pm$  écart-type) selon le statut de l'opérateur (expérimenté/novice) et la coloration (Vita-Eosine®/Sperm VitalStain®/Spermoscan®) (n = 18)

% d'anomalies (m $\pm$ sd)	Vita-Eosine®	Sperm VitalStain®	Spermoscan®
<b>Total</b>			
Expérimenté	21,2 <sup>A</sup> $\pm$ 16,1	16,0 <sup>A</sup> $\pm$ 12,3	12,9 <sup>A</sup> $\pm$ 8,7
Novice	28,3 <sup>B</sup> $\pm$ 15,1	28,6 <sup>B</sup> $\pm$ 10,1	28,2 <sup>B</sup> $\pm$ 10,2
<b>Tête</b>			
Expérimenté	5,2 <sup>A</sup> $\pm$ 4,3	5,3 <sup>A</sup> $\pm$ 4,0	7,1 <sup>A</sup> $\pm$ 6,5
Novice	7,6 <sup>B</sup> $\pm$ 5,6	8,8 <sup>B</sup> $\pm$ 6,8	9,6 <sup>B</sup> $\pm$ 9,1
<b>Pièce intermédiaire</b>			
Expérimenté	1,4 <sup>A</sup> $\pm$ 2,5	6,0 <sup>A</sup> $\pm$ 10,2	2,0 <sup>A</sup> $\pm$ 3,4
Novice	1,4 <sup>A</sup> $\pm$ 1,1	5,1 <sup>A</sup> $\pm$ 7,3	1,0 <sup>A</sup> $\pm$ 1,1
<b>Queue</b>			
Expérimenté	14,7 <sup>A</sup> $\pm$ 13,4	4,7 <sup>A</sup> $\pm$ 2,7	3,8 <sup>A</sup> $\pm$ 2,7
Novice	19,3 <sup>B</sup> $\pm$ 12,7	15,9 <sup>B</sup> $\pm$ 8,0	17,5 <sup>B</sup> $\pm$ 8,7

<sup>A, B</sup> : les valeurs avec des exposants différents dans la même colonne sont significativement différentes ( $p < 0,05$  ; ANOVA) ; les valeurs sur une même ligne obtenues par l'opérateur expérimenté sont analysées dans la partie II.3.c.

**L'opérateur novice a significativement dénombré plus d'anomalies morphologiques que l'opérateur expérimenté** ( $p < 0,05$ ) (Tableau 7). Cette différence est plus ou moins accentuée en fonction de la coloration utilisée. La différence est la plus faible avec le kit Vita-Eosine® avec 7,1 % d'écart entre l'opérateur expérimenté et l'opérateur novice. Cette différence entre opérateurs est plus élevée (15,3 %) avec l'utilisation du kit Spermoscan®. Le nombre d'anomalies morphologiques comptées par le novice est stable quel que soit la coloration utilisée (environ 28 % d'anomalies morphologiques pour chaque colorant) contrairement à l'opérateur expérimenté dont le nombre d'anomalies morphologiques mis en évidence décroît lorsque l'on passe de la coloration Vita-Eosine® (21,2  $\pm$  16,1 %), à la coloration Sperm VitalStain® (16,0  $\pm$  12,3 %), à la coloration Spermoscan® (12,9  $\pm$  8,7 %).

À la lecture de la moyenne ( $\pm$  écart-type) d'anomalies de queue (Tableau 7), il apparaît une grande différence entre les opérateurs, principalement avec les kits

Sperm VitalStain® et Spermoscan® (11,2 % avec Sperm Vital stain® et 13,7 % avec Spermoscan®). Les anomalies de queue regroupent les queues enroulées proximale ou distale, les queues courtes et les queues repliées. En détaillant chaque type d'anomalie (Tableau 8), le lecteur novice compte (moyenne  $\pm$  écart-type) 10,2  $\pm$  5,4 % de queues repliées avec le colorant Sperm VitalStain® alors que le lecteur expérimenté en compte 2,6  $\pm$  2,0 %. Cet écart est également important avec le colorant Spermoscan® (11,7  $\pm$  6,0 % vs 2,7  $\pm$  2,4 %). **La moyenne de queues repliées est plus élevée lorsque la lecture est effectuée par l'opérateur novice avec les trois colorations ( $p < 0,05$ ). Cette différence est principalement visible sur les colorations Sperm VitalStain® et Spermoscan®.**

Tableau 8 : Pourcentage d'anomalies de la queue (moyenne  $\pm$  écart-type) selon le type d'anomalies de la queue, le statut de l'opérateur (expérimenté/novice) et la coloration (Vita-Eosine®, Sperm VitalStain®, Spermoscan®)

% d'anomalies (m $\pm$ sd)	Vita-Eosine®	Sperm VitalStain®	Spermoscan®
<b>Queue (total)</b>			
Expérimenté	14,7 <sup>A</sup> $\pm$ 13,4	4,7 <sup>A</sup> $\pm$ 2,7	3,8 <sup>A</sup> $\pm$ 2,7
Novice	19,3 <sup>B</sup> $\pm$ 12,7	15,9 <sup>B</sup> $\pm$ 8,0	17,5 <sup>B</sup> $\pm$ 8,7
<b>Queue repliée</b>			
Expérimenté	10,7 <sup>A</sup> $\pm$ 10,1	2,6 <sup>A</sup> $\pm$ 2,0	2,7 <sup>A</sup> $\pm$ 2,4
Novice	13,2 <sup>B</sup> $\pm$ 9,2	10,2 <sup>B</sup> $\pm$ 5,4	11,7 <sup>B</sup> $\pm$ 6,0
<b>Queue enroulée proximale</b>			
Expérimenté	2,0 <sup>A</sup> $\pm$ 2,0	1,5 <sup>A</sup> $\pm$ 1,3	1,0 <sup>A</sup> $\pm$ 0,9
Novice	3,1 <sup>B</sup> $\pm$ 2,8	3,4 <sup>B</sup> $\pm$ 2,6	4,1 <sup>B</sup> $\pm$ 4,1
<b>Queue enroulée distale</b>			
Expérimenté	1,8 <sup>A</sup> $\pm$ 4,4	0,5 <sup>A</sup> $\pm$ 1,2	0,1 <sup>A</sup> $\pm$ 0,3
Novice	3,0 <sup>B</sup> $\pm$ 3,8	2,1 <sup>B</sup> $\pm$ 2,7	1,4 <sup>B</sup> $\pm$ 2,5
<b>Queue courte</b>			
Expérimenté	0,1 <sup>A</sup> $\pm$ 0,4	0,1 <sup>A</sup> $\pm$ 0,3	0,1 <sup>A</sup> $\pm$ 0,3
Novice	0,1 <sup>A</sup> $\pm$ 0,2	0,2 <sup>A</sup> $\pm$ 0,4	0,3 <sup>A</sup> $\pm$ 0,7

<sup>A, B</sup> : les valeurs avec des exposants différents dans la même colonne sont significativement différentes ( $p < 0,05$  ; ANOVA) ; les valeurs sur une même ligne obtenues par l'opérateur expérimenté sont analysées dans la partie II.3.c.

Lorsque les queues repliées sont exclues de l'analyse, l'opérateur novice obtient, de nouveau, des résultats supérieurs à l'opérateur expérimenté. Néanmoins, les divergences entre opérateurs selon les colorants ne sont plus significatives ( $p > 0,05$ ). **L'interaction entre l'opérateur et la coloration est principalement due à une différence de perception des queues repliées.**

b. Relation entre la dilution et les anomalies morphologiques

L'analyse statistique par ANOVA sur les 18 jeux de lames a mis en évidence une interaction significative entre coloration et dilution ( $p < 0,001$ ). Il en est de même si seules les 23 lames Vita-Eosine® et Sperm VitalStain® sont comparées ( $p < 0,001$ ) (Tableau 20, Annexe III).

Tableau 9 : Influence de l'état de dilution (dilué/non dilué) et de la coloration sur le pourcentage d'anomalies morphologiques (moyenne  $\pm$  écart-type) ( $n = 18$ )

% d'anomalies (m $\pm$ sd)	Vita-Eosine®	Sperm VitalStain®	SpermSCAN®
<b>Total</b>			
Sperme dilué	16,1 <sup>A</sup> $\pm$ 8,8	19,6 <sup>A</sup> $\pm$ 10,3	19,3 <sup>A</sup> $\pm$ 10,8
Sperme non dilué	33,4 <sup>B</sup> $\pm$ 16,8	25,2 <sup>B</sup> $\pm$ 14,6	21,8 <sup>A</sup> $\pm$ 13,4
<b>Tête</b>			
Sperme dilué	5,4 <sup>A</sup> $\pm$ 3,8	5,8 <sup>A</sup> $\pm$ 3,8	7,1 <sup>A</sup> $\pm$ 6,6
Sperme non dilué	7,4 <sup>B</sup> $\pm$ 6,0	8,3 <sup>B</sup> $\pm$ 6,8	9,5 <sup>B</sup> $\pm$ 9,1
<b>Pièce intermédiaire (PI)</b>			
Sperme dilué	1,2 <sup>A</sup> $\pm$ 1,2	5,6 <sup>A</sup> $\pm$ 6,5	1,3 <sup>A</sup> $\pm$ 1,5
Sperme non dilué	1,5 <sup>A</sup> $\pm$ 2,5	5,6 <sup>A</sup> $\pm$ 10,8	1,8 <sup>A</sup> $\pm$ 3,3
<b>Queue</b>			
Sperme dilué	9,5 <sup>A</sup> $\pm$ 7,4	8,2 <sup>A</sup> $\pm$ 6,1	10,9 <sup>A</sup> $\pm$ 9,9
Sperme non dilué	24,4 <sup>B</sup> $\pm$ 13,6	12,3 <sup>B</sup> $\pm$ 9,4	10,5 <sup>A</sup> $\pm$ 9,0

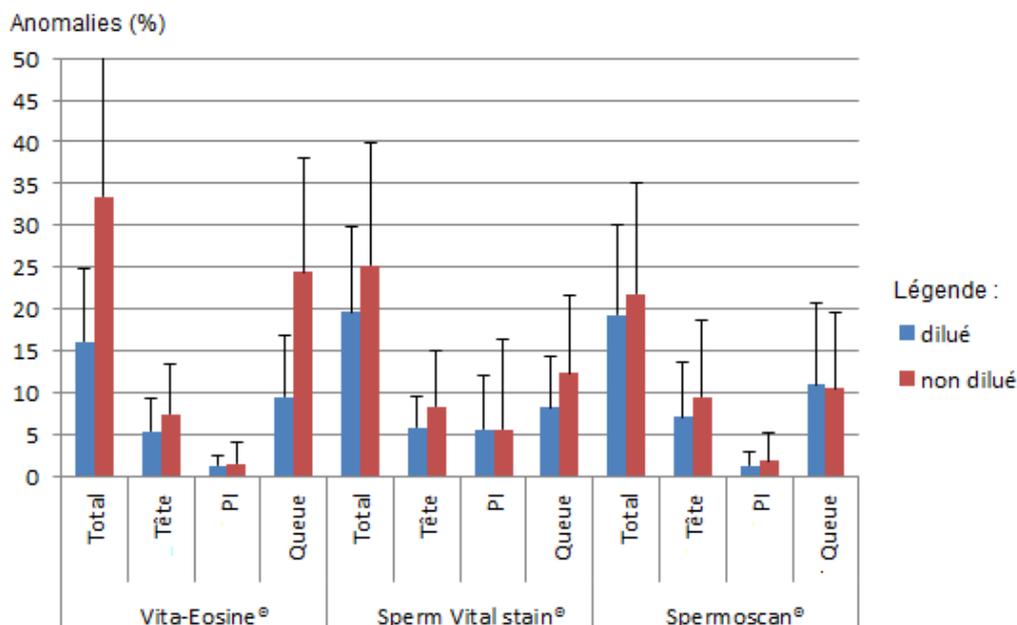
<sup>A, B</sup>: les valeurs avec des exposants différents dans la même colonne sont significativement différentes ( $p < 0,05$  ; ANOVA)

La coloration Vita-Eosine® présente une moyenne ( $\pm$  écart-type) d'anomalies morphologiques de  $33,4 \pm 16,8$  % lorsque la semence est non diluée et de  $16,1 \pm 8,8$

% lorsqu'elle est diluée. Cet écart est également présent avec la coloration Sperm VitalStain qui montre en moyenne ( $\pm$  écart-type)  $25,2 \pm 14,6$  % d'anomalies avec une semence non diluée et  $19,6 \pm 10,3$  % d'anomalies avec une semence diluée. **Les frottis Vita-Eosine® et Sperm VitalStain®, réalisés avec du sperme dilué, présentent un plus faible pourcentage d'anomalies morphologiques que ceux réalisés avec du sperme non dilué ( $p < 0,05$ ). Cette différence est plus marquée sur la coloration Vita-Eosine® avec un écart de 17,3 % d'anomalies entre la semence diluée et non diluée contre un écart de 5,6 % avec le Sperm VitalStain®.**

La coloration SpermScan® présente en moyenne ( $\pm$  écart-type)  $21,8 \pm 13,4$  % et  $19,3 \pm 10,8$  % d'anomalies morphologiques avec respectivement la semence non diluée et diluée. Cette faible différence est non significative ( $p = 0,2$ ). **La dilution n'a pas d'effet sur le dénombrement des anomalies morphologiques avec la coloration SpermScan®.**

En se focalisant sur la localisation de l'anomalie, il apparaît que cet « effet dilution » avec les kits Vita-Eosine® et Sperm VitalStain® provient essentiellement de la différence de pourcentage d'anomalies de queue (Graphique 4 et Tableau 21, Annexe V).



Graphique 4 : Influence de la dilution sur la fréquence des différentes anomalies (Tête/Pièce Intermédiaire (PI)/Queue) en fonction de la coloration (Vita-Eosine®/Sperm VitalStain®/SpermScan®)

### c. Relation entre la coloration et les anomalies morphologiques

- Etude sur l'ensemble des anomalies morphologiques

Pour cette partie, seuls les frottis non dilués lus par l'opérateur expérimenté ont été utilisés. Ceci correspond à l'étude des données de 29 taureaux pour lesquels nous disposons de lames colorées avec les 3 techniques.

Tableau 10 : Pourcentage d'anomalies morphologiques (moyenne  $\pm$  écart-type) selon la coloration (Vita-Eosine®/Sperm VitalStain®/Spermoscan®)

% d'anomalies (m $\pm$ sd)	Vita-Eosine®	Sperm VitalStain®	Spermoscan®
<b>Total</b>	27,2 <sup>a</sup> $\pm$ 16,5	21,7 <sup>b</sup> $\pm$ 19,5	16,0 <sup>c</sup> $\pm$ 14,5
<b>Tête</b>	8,1 <sup>a</sup> $\pm$ 10,3	7,4 <sup>a</sup> $\pm$ 7,9	9,5 <sup>a</sup> $\pm$ 12,3
<b>Pièce intermédiaire</b>	1,7 <sup>a</sup> $\pm$ 2,9	9,1 <sup>b</sup> $\pm$ 15,5	2,2 <sup>a</sup> $\pm$ 3,7
<b>Queue</b>	17,4 <sup>a</sup> $\pm$ 12,8	5,1 <sup>b</sup> $\pm$ 2,7	4,3 <sup>b</sup> $\pm$ 3,1

<sup>a, b, c</sup> : les valeurs avec des exposants différents sur la même ligne sont significativement différentes ( $p < 0,05$  ; ANOVA)

La fréquence des anomalies morphologiques est plus élevée avec la coloration Vita-Eosine® (27,2  $\pm$  16,5 %), suivi par la coloration Sperm VitalStain® (21,7  $\pm$  19,5 %) ; la moyenne ( $\pm$  écart-type) la plus basse est obtenue avec la coloration Spermoscan® (16,0  $\pm$  14,5 %) (Tableau 10).

En étudiant les résultats individuels du spermocytogramme, 10 taureaux sur 29 présentent des fréquences d'anomalies supérieures au seuil de 30 % avec le kit Vita-Eosine®, contre 5 avec le kit Sperm VitalStain® et 3 avec le Spermoscan®.

Ces résultats montrent qu'il existe un effet significatif de la coloration sur le nombre d'anomalies morphologiques comptabilisées ( $p < 0,05$ ). **Le nombre d'anomalies morphologiques apparaît significativement plus élevé avec la coloration Vita-Eosine® qu'avec la coloration Spermoscan® ( $p < 0,05$ ).**

En dissociant le nombre total d'anomalies morphologiques selon la localisation de l'anomalie ou selon la classification de Blom, chaque colorant donne des proportions différentes selon le type de classification considéré (Graphique 6 et Graphique 7, Annexe VI).

- Etude sur les anomalies de tête

Tableau 11 : Pourcentage d'anomalies de la tête (moyenne  $\pm$  écart-type) selon la coloration (Vita-Eosine®/Sperm VitalStain®/Spermoscan®)

% d'anomalies (m $\pm$ sd)	Vita-Eosine®	Sperm VitalStain®	Spermoscan®
<b>Tête (total)</b>	8,1 <sup>a</sup> $\pm$ 10,3	7,4 <sup>a</sup> $\pm$ 7,9	9,5 <sup>a</sup> $\pm$ 12,3
<b>Tête seule</b>	3,8 <sup>a</sup> $\pm$ 3,4	3,6 <sup>a</sup> $\pm$ 4,0	4,3 <sup>a</sup> $\pm$ 5,6
<b>Tête déformée</b>	3,4 <sup>a</sup> $\pm$ 7,4	3,2 <sup>a</sup> $\pm$ 5,4	4,5 <sup>a</sup> $\pm$ 9,5
<b>Tête repliée</b>	0,9 <sup>a</sup> $\pm$ 2,0	0,4 <sup>a</sup> $\pm$ 0,9	0,7 <sup>a</sup> $\pm$ 1,2

<sup>a, b</sup> : les valeurs avec des exposants différents sur la même ligne sont significativement différentes ( $p < 0,05$  ; ANOVA)

**Il n'y a pas d'effet significatif de la coloration sur le nombre d'anomalies morphologiques de la tête** ( $p = 0,3$ ). Sur les 29 taureaux, deux présentent un pourcentage d'anomalies supérieur à 20% avec les trois colorations. Le Spermoscan® détecte un taureau supplémentaire.

- Etude sur les anomalies de pièce intermédiaire

Tableau 12 : Pourcentage d'anomalies de la pièce intermédiaire (moyenne  $\pm$  écart-type) selon la coloration (Vita-Eosine®/Sperm VitalStain®/Spermoscan®)

% d'anomalies (m $\pm$ sd)	Vita-Eosine®	Sperm VitalStain®	Spermoscan®
<b>Pièce intermédiaire (total)</b>	1,7 <sup>a</sup> $\pm$ 2,9	9,1 <sup>b</sup> $\pm$ 15,5	2,2 <sup>a</sup> $\pm$ 3,7
<b>Gouttelette proximale</b>	0,9 <sup>a</sup> $\pm$ 1,9	4,1 <sup>b</sup> $\pm$ 10,8	0,9 <sup>a</sup> $\pm$ 3,1
<b>Gouttelette distale</b>	0,1 <sup>a</sup> $\pm$ 0,7	2,9 <sup>b</sup> $\pm$ 8,0	0,3 <sup>a</sup> $\pm$ 0,7
<b>PI* déformée</b>	0,5 <sup>a</sup> $\pm$ 0,8	1,8 <sup>b</sup> $\pm$ 1,7	0,8 <sup>a</sup> $\pm$ 1,0
<b>Rupture PI*</b>	0,2 <sup>a</sup> $\pm$ 0,3	0,2 <sup>a</sup> $\pm$ 0,5	0,2 <sup>a</sup> $\pm$ 0,6

\* PI = Pièce Intermédiaire

<sup>a, b</sup> : les valeurs avec des exposants différents sur la même ligne sont significativement différentes ( $p < 0,05$  ; ANOVA)

La coloration Sperm VitalStain® indique une moyenne ( $\pm$  écart-type) de  $9,1 \pm 15,5$  % d'anomalies de la pièce intermédiaire alors que la coloration SpermScan® indique  $2,2 \pm 3,7$  %, la coloration Vita-Eosine® indiquant  $1,7 \pm 2,9$  % (Tableau 12). **La coloration Sperm VitalStain® met significativement en évidence plus d'anomalies de la pièce intermédiaire que la coloration SpermScan® et la coloration Vita-Eosine® ( $p < 0,05$ ). Il n'y a pas de différences significatives entre la coloration SpermScan® et la coloration Vita-Eosine® ( $p = 0,1$ ).**

Une différence significative existe entre les colorations sur la présence de gouttelettes et de déformations ( $p < 0,05$ ). La coloration Sperm VitalStain® montre plus de ces anomalies. Il n'existe pas de différence significative entre les colorations sur la présence d'une rupture de pièce ( $p = 0,6$ ).

- Etude sur les anomalies de queue

Tableau 13 : Pourcentage d'anomalies de la queue (moyenne  $\pm$  écart-type) selon la coloration (Vita-Eosine®/Sperm VitalStain®/SpermScan®)

% d'anomalies (m $\pm$ sd)	Vita-Eosine®	Sperm VitalStain®	SpermScan®
Queue (total)	$17,4^a \pm 12,8$	$5,1^b \pm 2,7$	$4,3^b \pm 3,1$
Queue repliée	$12,7^a \pm 9,9$	$2,8^b \pm 1,9$	$2,6^b \pm 2,5$
Queue enroulée proximale	$2,8^a \pm 2,9$	$1,7^a \pm 1,3$	$1,4^a \pm 1,3$
Queue enroulée distale	$1,8^a \pm 4,6$	$0,5^b \pm 1,3$	$0,2^b \pm 0,4$
Queue courte	$0,1^a \pm 0,3$	$0,1^a \pm 0,2$	$0,1^a \pm 0,4$

<sup>a, b</sup> : les valeurs avec des exposants différents sur la même ligne sont significativement différentes ( $p < 0,05$  ; ANOVA)

La coloration Vita-Eosine® révèle le taux le plus élevé d'anomalies de queue avec en moyenne ( $\pm$  écart-type)  $17,4 \pm 12,8$  %. Les colorations Sperm VitalStain® et SpermScan® présentent respectivement en moyenne ( $\pm$  écart-type)  $5,1 \pm 2,7$  % et  $4,3 \pm 3,1$  % d'anomalies de queue (Tableau 13). Il n'existe pas de différences significatives entre les colorations Sperm VitalStain® et SpermScan® ( $p = 0,1$ ).

**La coloration Vita-Eosine® met significativement en évidence plus d'anomalies de queue que la coloration Sperm VitalStain® ( $p < 0,001$ ) et que la coloration SpermScan® ( $p < 0,001$ ).**

La principale différence entre les colorations porte sur l'anomalie de la queue repliée (Tableau 13 et Graphique 5 présenté en Annexe IV). La coloration Vita-Eosine® révèle en moyenne ( $\pm$  écart-type)  $12,7 \pm 9,9$  % de queues repliées alors que les colorations Sperm VitalStain® et Spermoscan® présentent respectivement  $2,8 \pm 1,9$  % et  $2,6 \pm 2,5$  % d'anomalies de queue repliée (Tableau 13). **La coloration Vita-Eosine® est associée à un nombre significativement plus élevé ( $p < 0,001$ ) de queues repliées que les deux autres méthodes.**

- Etude sur les anomalies majeures et mineures

Tableau 14 : Pourcentage d'anomalies majeures et mineures (moyenne  $\pm$  écart-type) selon la coloration (Vita-Eosine®/Sperm VitalStain®/Spermoscan®)

% d'anomalies (m $\pm$ sd)	Vita-Eosine®	Sperm VitalStain®	Spermoscan®
<b>Majeures</b>	7,8 <sup>a, b</sup> $\pm$ 8,6	10,8 <sup>b</sup> $\pm$ 14,5	7,8 <sup>a</sup> $\pm$ 10,3
<b>Mineures</b>	19,4 <sup>a</sup> $\pm$ 12,9	10,9 <sup>b</sup> $\pm$ 11,8	8,3 <sup>b</sup> $\pm$ 7,4

<sup>a, b</sup> : les valeurs avec des exposants différents sur la même ligne sont significativement différentes ( $p < 0,05$  ; ANOVA)

Les anomalies majeures apparaissent plus fréquentes avec le colorant Sperm VitalStain® ( $10,8 \pm 14,5$  %) qu'avec le colorant Vita-Eosine® ( $7,8 \pm 8,6$  %) et le colorant Spermoscan® ( $7,8 \pm 10,3$  %) (Tableau 14). Au vu des résultats exposés précédemment, cette différence proviendrait de la faculté du Sperm VitalStain® à mettre plus facilement en évidence les gouttelettes proximales et les déformations de la pièce intermédiaire. Cette proportion d'anomalies majeures plus importante avec le Sperm VitalStain® n'est pas significative par rapport au colorant Vita-Eosine ( $p = 0,09$ ) mais est significative par rapport au colorant Spermoscan® ( $p = 0,02$ ).

Les anomalies mineures apparaissent plus fréquentes avec le colorant Vita-Eosine® ( $19,4 \pm 12,9$  %), qu'avec le colorant Sperm VitalStain® ( $10,9 \pm 11,8$  %) et le colorant Spermoscan® ( $8,3 \pm 7,4$  %) (Tableau 14). Cette différence est significative ( $p < 0,05$ ), **la coloration Vita-Eosine® met en évidence plus d'anomalies mineures que les deux autres colorations.** La différence entre le Sperm VitalStain® et le Spermoscan® est non significative ( $p = 0,3$ ). D'après les résultats précédents, cette différence provient de la mise en évidence importante de queues repliées avec la coloration Vita-Eosine®.

### III. DISCUSSION

#### 1. Discussion du matériel et méthode

##### a. Choix des animaux utilisés

- Race

Dans notre étude, plusieurs races de taureau ont été utilisées, les races charolaise et limousine étant les plus représentées. Il existe une association entre anomalies morphologiques et races (Menon et al. 2011 ; Barth et Waldner, 2002). Il est décrit que les anomalies de la tête du spermatozoïde sont moins fréquentes dans la race limousine que dans la race charolaise. Néanmoins, le pourcentage d'anomalies de la pièce intermédiaire et le pourcentage total d'anomalies morphologiques ne sont pas significativement différents, quelle que soit la race du bovin (Menon et al. 2011). Ainsi, le facteur race n'a pas dû agir sur notre échantillon par rapport au pourcentage total d'anomalies.

- Âge

Tous les taureaux utilisés dans l'étude ont plus de 1,5 an et ont atteint leur puberté. Cependant, quatorze d'entre eux ont entre 1,5 et 3 ans et n'ont probablement pas atteint leur maturité sexuelle. La production totale de sperme, dépendante du poids du testicule et de l'âge, est à son optimum entre 4 et 5 ans (Everett et Bean, 1982 ; Mathevon et al., 1998). Chez les animaux âgés de plus de 1,5 an, il ne semble pas y avoir d'association entre anomalies morphologiques et âge ni entre anomalies morphologiques et circonférence scrotale (Menon et al., 2011). Le facteur âge n'a pas dû jouer de rôle dans notre échantillon.

- Pathologie : la besnoitiose (*Besnoitia besnoiti*)

Kumi-Diaka et al. (1981) ont mis en évidence la relation entre la besnoitiose et le spermogramme ; chez un taureau séropositif le nombre d'anomalies est plus élevé et la vitalité du sperme est plus faible que chez un taureau séronégatif. Les différents degrés de l'inflammation des testicules et de la dégénérescence de l'épididyme sont concourants avec l'oligospermie. Cela pourrait s'expliquer par la présence de kystes dans les testicules interférant avec la spermatogénèse et l'épaississement de la peau du scrotum, engendrant une dégénérescence possible des testicules et de l'épididyme par diminution des capacités de thermorégulation (Kumi-Diaka et al., 1981).

Cependant, la thèse de Simon FLORENTIN (« La semence de taureaux infectés par *Besnoitia besnoiti* : moindre qualité et source de contamination ? ») utilisant les mêmes données que notre étude ne montre pas de relation entre la vitalité et la séropositivité ainsi qu'entre la motilité individuelle et la séropositivité. Il semble donc que la faible vitalité soit due à d'autres facteurs.

- Autres causes de dégénérescence testiculaire

Comme indiqué dans la partie précédente (III.1.a. Pathologie : la besnoitiose), un défaut permanent de thermorégulation dû notamment à l'épaississement de la peau (voire à la sclérodermie) conduit à une dégénérescence testiculaire. Un défaut de thermorégulation à court terme telle une hyperthermie transitoire générale (fièvre lors de la phase d'état, exercice violent,...) ou locale (orchite unilatérale) ou tel un refroidissement extrême (gelure du scrotum) entraîne également une dégénérescence testiculaire. Lagerlöf (cité par Derivaux, 1958) a montré que lorsque le scrotum du bovin est maintenu au chaud pendant 4 à 5 jours, la motilité et la morphologie des spermatozoïdes sont affectées. Il faut alors une période de 4 à 5 semaines pour que la semence redevienne normale. Si l'excès de température est maintenu pendant 11 à 16 jours, le nombre de spermatozoïdes produits est réduit et la proportion d'anomalies morphologiques augmente (Arthur et al., 1989).

D'autres facteurs de dégénérescence sont : une ischémie testiculaire, une occlusion congénitale des tubes efférents, une affection auto-immune, une toxine, une déficience en gonadotropine, ou une infection virale (Lester et Larson, 1986).

Lors de troubles affectant la spermatogénèse, la répercussion sur la semence n'est visible qu'au bout de deux mois (durée de la spermatogénèse (54 jours) associée à la durée du transit épидидymaire (9 à 13 jours) (Clermont, 1972).

Ainsi, les résultats obtenus peuvent correspondre à un événement ponctuel survenu il y a deux mois ou à une affection chronique.

#### b. Choix de la méthode de collecte : l'électroéjaculateur

La collecte à l'électroéjaculateur ne présente pas d'effet significatif par rapport à la collecte au vagin artificiel sur l'évaluation de la vitalité et des anomalies morphologiques de spermatozoïdes. Il en est de même pour les pourcentages d'anomalies majeures et mineures. En revanche, elle a un effet significatif de réduction de la concentration et de la motilité (Rigal, 2008).

Le massage rectal aboutit à des échantillons de sperme présentant une concentration, une motilité et une vitalité plus faibles en comparaison à l'électroéjaculateur. L'évaluation des anomalies morphologiques ne diffère pas entre les deux méthodes (Palmer et al., 2005).

Pour notre étude, l'électroéjaculation était la seule méthode utilisable sur des taureaux de monte naturelle qu'il n'aurait sans doute pas été possible de récolter à l'aide d'un vagin artificiel ; de plus, il aurait fallu disposer d'un animal boute-en-train (vache en chaleurs) dont la contention aurait entraîné des risques supplémentaires pour les opérateurs. Cependant, cette méthode de collecte a sans doute été responsable d'un effet de dilution important sur certains échantillons ce qui a entraîné des frottis pauvres en cellules et des comptages fastidieux.

### c. Choix du nombre de spermatozoïdes comptés

Lors de cette étude, le choix du nombre de spermatozoïdes comptés a été fait en suivant les instructions du fabricant, à savoir lire 200 spermatozoïdes par frottis pour l'évaluation des anomalies morphologiques. Selon Kuster et al. (2004), dans la plupart des cas, il semble qu'il y ait peu de précision supplémentaire en comptant plus de 100 spermatozoïdes. Cependant, lorsque le pourcentage de spermatozoïdes morphologiquement anormaux est élevé et de nombreux types d'anomalies sont présents, il recommande de comptabiliser « 500 ou plus » spermatozoïdes. Cependant, en raison de contraintes de temps, compter plus de 200 cellules est souvent considéré comme difficilement réalisable. Un comptage se basant sur 100 spermatozoïdes est un point de départ acceptable, cependant un minimum de 200 spermatozoïdes devrait être compté dans la plupart des cas (Kuster et al., 2004).

Dans la plupart des études comparant les colorations vitales ou totales, le nombre de spermatozoïdes comptés est soit de 100 (Way et al., 1995 ; Sprecher et Coe, 1996), soit de 200 (Björndahl et al., 2003 ; Freneau et al., 2010). Certaines études vont jusqu'à compter 300 cellules (Łukaszewicz et al., 2008). Compter 200 spermatozoïdes par lame semble donc avoir été un bon compromis entre le temps de lecture et la précision des résultats.

## 2. Analyse et discussion des résultats

### a. Avantages et inconvénients de chaque coloration

Le Tableau 15 compare les avantages et les inconvénients que présente chaque coloration lors de la lecture des lames. Ce tableau a été obtenu à partir des résultats de la partie II.1. et du ressenti personnel des opérateurs lors de la réalisation des colorations des lames. Ce tableau est présenté à titre indicatif.

Tableau 15 : Comparaison des avantages et inconvénients propres à chacune des colorations

Coloration	Avantages	Inconvénients
Vita-Eosine®	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Lecture facile</li> <li>- Bonne coloration des spermatozoïdes morts</li> <li>- Contour des spermatozoïdes bien définis</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 2 étapes de coloration : augmente les risques d'erreur de manipulation</li> <li>- Important effet dilution</li> </ul>
Sperm VitalStain®	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Une seule étape de coloration : plus rapide et moins d'erreur possible</li> <li>- Contour des spermatozoïdes bien définis</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Spermatozoïdes morts pas toujours bien colorés</li> </ul>
Spermoscan®	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Méthode de coloration rapide et facile</li> <li>- Présence d'un fixateur</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Lecture parfois laborieuse</li> <li>- Temps passé par spermatozoïde pour détecter une anomalie plus long (spermatozoïdes plus difficiles à discerner)</li> <li>- Pièce intermédiaire difficile à individualiser</li> <li>- Mise au point parfois difficile</li> <li>- Quelques frottis illisibles par défaut de coloration</li> </ul>

#### b. Evaluation de la vitalité

Aucune relation n'a été mise en évidence entre la vitalité et la motilité individuelle que ce soit avec la coloration Vita-Eosine® ou avec la coloration Sperm VitalStain®. Plusieurs frottis présentent 0 % de spermatozoïdes vivants malgré une motilité individuelle non nulle (Exemple : 0 % de spermatozoïdes vivants avec un sperme présentant une motilité individuelle de 75 %). Or, le pourcentage de spermatozoïdes vivants est normalement corrélé à la motilité individuelle (Barth et Waldner, 2002). Ceci pourrait s'expliquer par un problème de méthode de coloration du sperme. La température du colorant a une action significative sur le pourcentage de spermatozoïdes colorés (c'est-à-dire considérés comme morts). Lorsque la coloration est réalisée à la température de 15°C, le pourcentage de spermatozoïdes colorés est plus élevé que lorsqu'elle est réalisée à 28°C. Cette action de la température sur la

mortalité est plus marquée lorsque la durée d'action est plus longue. Plus le temps de contact avec un colorant à 15°C est important, plus la mortalité est élevée (Ortavant et al., 1952). En septembre 2013 à Seyne-les-Alpes, la température ambiante moyenne était proche de 15°C. Une trop longue latence entre la préparation de la coloration et la réalisation du frottis pourrait expliquer la discordance observée entre la mortalité et la motilité individuelle sur certains frottis.

Les lecteurs ont observé une mortalité plus importante avec l'utilisation du kit Vita-Eosine® par rapport au kit Sperm VitalStain® ( $p < 0,05$ ). La réalisation de la coloration Vita-Eosine® nécessite deux étapes de 30 secondes (l'éosine est dissociée de la nigrosine, Figure 1) alors que la coloration Sperm VitalStain® nécessite une étape unique de 30 secondes (Figure 2). Lors de la coloration Vita-Eosine®, le sperme est donc exposé deux fois plus longtemps aux colorants que lors de la coloration Sperm VitalStain®. Cette différence de temps de coloration avec des colorants à une température proche de 15°C pourrait être une explication à la vitalité plus faible avec l'utilisation de la coloration Vita-Eosine®.

Une seconde explication pourrait être fournie par Björndahl et al. (2003) qui ont comparé, chez l'Homme, la coloration éosine/nigrosine en une étape (comme le Sperm VitalStain®) et en deux étapes (comme le Vita-Eosine®). Dans cette étude, la coloration en deux étapes était associée à une plus forte mortalité. Ceci est expliqué par l'effet toxique de l'éosine 5 % (Eliasson, 1977 cité par (Björndahl et al., 2003)). Il a été montré que l'utilisation d'éosine seule produit des estimations plus élevées de cellules colorées que ne le fait le procédé utilisant de l'éosine-nigrosine (Cooper et Hellenkemper, 2009).

En abaissant la concentration d'éosine pour diminuer l'effet toxique, c'est la pression osmotique qui vient affecter la vitalité des spermatozoïdes. L'intégrité de la membrane n'est pas affectée tant que l'osmolalité de la solution est comprise entre 200 et 300 mOsm/kg (Liu et Foote, 1998). Eliasson (1977), en diminuant la concentration d'éosine de 5 % à 1 %, fait passer l'osmolalité de la solution d'éosine de 237 mOsm/kg à 133 mOsm/kg (Björndahl et al., 2004). Le spermatozoïde est alors confronté à un stress hypo-osmotique, l'eau pénètre à l'intérieur de la cellule, engendrant son gonflement. Ce stress hypo-osmotique provoqué par la coloration en

deux étapes augmente la mortalité (Martínez, 2004). La réalisation d'un mélange éosine-nigrosine permettant une coloration en une étape minimise les effets (toxicité et hypo-osmolarité) de l'éosine sur les spermatozoïdes.

Nous avons observé une mortalité plus élevée sur les lames de semence diluée à l'aide du Bioxcell® qu'en l'absence de dilution. L'utilisation du dilueur masque la différence discutée précédemment entre les deux types de coloration. Janett et al. (2005) ont montré que le dilueur Bioxcell® fournit de moins bons résultats concernant la vitalité que le dilueur à base de jaune d'œuf Triladyl® (Minitube, Allemagne), le Bioxcell® entraînant une altération de l'intégrité de la membrane spermatique. L'explication de cette diminution de la vitalité ne semble pas provenir de l'effet température et/ou pH du dilueur : le Bioxcell®, lors de la manipulation, est maintenu à la même température que les spermatozoïdes et son pH neutre (compris entre 6,7 et 7,0) appartient à l'intervalle donné par Mayer et al. (1951) pour le maximum de vitalité avec un colorant. Mais une explication pourrait être donnée par l'osmolalité du dilueur. Il est indiqué que l'osmolalité du dilueur Bioxcell® est comprise entre 1250 et 1450 mOsm/kg après dilution dans 400mL d'eau distillée. La proportion de spermatozoïdes non colorés est peu affectée lorsque la pression osmotique reste inférieure à 732 mOsm/kg. Mais une fois cette limite dépassée le nombre de spermatozoïdes colorés augmente (Liu et Foote, 1998). L'association colorant/dilueur entraîne, de façon artéfactuelle, une augmentation de la mortalité.

Le lecteur novice obtient des résultats similaires à l'opérateur expérimenté à propos de l'effet de la coloration sur la vitalité (vitalité plus faible avec Vita-Eosine® en comparaison à Sperm VitalStain®).

Avec la coloration Sperm VitalStain®, la différence de vitalité entre la semence diluée et non diluée obtenue par l'opérateur novice est moins marquée que celle obtenue par l'opérateur expérimenté (10 % de différence entre dilué et non dilué lorsque l'opérateur est novice contre 50 % lorsque l'opérateur est expérimenté), mais cette différence reste significative ( $p = 0,04$ ). L'effet opérateur n'est présent que sur cette coloration lorsque le sperme est dilué. Cela pourrait s'expliquer par la difficulté

éprouvée par le lecteur novice, avec cette coloration, à différencier les spermatozoïdes morts des vivants (résultats avoisinant les 50 %). Avec la coloration Vita-Eosine®, nous n'avons pas observé d'effet opérateur.

### c. Effet de l'opérateur sur les résultats du spermocytogramme

L'effet opérateur a été reconnu comme significatif dans différentes études ayant porté, par exemple, sur la semence de cheval (Brito et al., 2011) ou de chien (Root Kustritz et al. 1998). Une explication donnée est l'aspect subjectif de l'évaluation de la morphologie du spermatozoïde. Cette évaluation est tributaire de la compétence et de l'expérience de l'évaluateur.

L'opérateur novice relève plus d'anomalies morphologiques que l'opérateur expérimenté. Cette différence est principalement marquée sur l'anomalie de la queue repliée. L'évaluation de cette anomalie est considérée comme subjective, le degré de repliement nécessaire pour que ce soit considéré comme une anomalie étant différent entre les opérateurs.

L'effet opérateur est plus marqué lors de l'utilisation du SpermSCAN®. Ceci pourrait s'expliquer par la difficulté plus importante à discerner les spermatozoïdes avec cette coloration qui ne possède pas de colorant de fond. Une seconde explication peut être la différence du degré de dilution selon la coloration. La coloration Vita-Eosine® dilue le sperme au ¼ et la coloration Sperm VitalStain® dilue le sperme au ½ alors que le SpermSCAN® n'entraîne pas de dilution (frottis réalisé avant la coloration). Il est plus facile de distinguer les spermatozoïdes des uns des autres avec les colorations Vita-Eosine® et Sperm VitalStain® que sur la coloration SpermSCAN®. Sans « effet dilution » de la coloration (telle la coloration SpermSCAN®), les spermatozoïdes des lames fortement concentrées se chevauchent du fait de leur grand nombre sur un même champ.

#### d. Effet des colorants sur les résultats du spermocytogramme

Notre étude montre que les colorations Vita-Eosine®, Sperm VitalStain® et SpermScan® ne donnent pas les mêmes pourcentages d'anomalies morphologiques et chaque type d'anomalie n'est pas présent dans les mêmes proportions suivant la coloration considérée. Des études, menées sur différentes espèces (Hommes, bovins, chevaux, chiens), comparant différentes techniques de coloration du sperme, montrent que chaque coloration peut augmenter la fréquence d'une anomalie et que peu de corrélations existent entre les différentes techniques (Freneau et al., 2010 ; Meschede et al., 1993 ; Brito et al., 2011 ; Root Kustritz et al., 1998). Dans leur étude, Brito et al. (2011) considèrent que les différences de résultats d'anomalies morphologiques peuvent être attribuées à l'introduction d'artéfacts, à une pauvre définition des structures du spermatozoïde ou à un effet opérateur.

La coloration Vita-Eosine® révèle un plus grand nombre de queues repliées, ce qui majore le nombre d'anomalies mineures en comparaison des deux autres colorations. La queue repliée est souvent considérée comme un artéfact (Derivaux, 1958). La présence d'artéfacts sur un frottis peut être due au colorant et à la technique de préparation.

Un changement de la composition chimique du colorant peut entraîner un changement morphologique (Root Kustritz et al., 1998). Ainsi, un colorant hypotonique peut augmenter la fréquence des queues repliées (Root Kustritz et al., 1998 ; Freneau et al. 2010). L'hypo-osmolalité de l'éosine pourrait expliquer le nombre plus important de queues repliées avec la coloration Vita-Eosine®. Freneau et al. (2010) montrent également une plus grande fréquence de queues simplement repliées et d'anomalies mineures avec l'utilisation d'une coloration éosine-nigrosine. Un séchage rapide pour diminuer le temps d'exposition au colorant hypo-osmotique prévient l'augmentation de queues repliées (Root Kustritz et al. 1998). Or dans notre étude, les frottis ont été laissés à sécher à l'air libre : ce temps de séchage a pu être trop long et augmenter la fréquence des queues repliées.

Hormis l'effet hypo-osmotique, les artéfacts peuvent être dus à la méthode de préparation, par un effet mécanique ou thermique. Lorsqu'un frottis coloré à l'éosine-

nigrosine est comparé à un montage humide entre lame et lamelle, le nombre de têtes détachées et de pièces intermédiaires cassées augmente (Freneau et al., 2010) dû à l'effet mécanique ; l'étalement du sperme entraînerait mécaniquement la rupture des flagelles. L'incidence des queues repliées peut être augmentée par le froid. Cette incidence est plus élevée lors d'une coloration à 5°C qu'à 30°C (Derivaux, 1958 ; Hancock, 1957 cité par Cameron, 1977).

Le SpermScan® comporte une étape de fixation du frottis avant les étapes de coloration. Chez le chien, la coloration avec fixation diminue les artéfacts portant sur les anomalies morphologiques et surtout celles concernant la queue (Martínez, 2004).

Notre étude montre que le Sperm VitalStain® est associé à un plus grand nombre d'anomalies de la pièce intermédiaire que la coloration Vita-Eosine® alors que la définition de la pièce intermédiaire est considérée bonne avec les deux techniques. Ceci pourrait être dû au fait que la technique du frottis entraîne une distribution irrégulière des gouttelettes sur les lames (Freneau et al., 2010). D'autre part, la coloration SpermScan® ne met pas en évidence moins d'anomalies de la pièce intermédiaire malgré une perception difficile de cette pièce. Ceci est en contradiction avec l'étude de Guerin (1997) qui obtient un plus faible pourcentage d'anomalie de la pièce intermédiaire avec une coloration totale chez le chien (Spermac®) en comparaison à la coloration éosine-nigrosine, en argumentant sur la faible définition de la pièce intermédiaire. Cette visualisation difficile de la pièce intermédiaire peut être due à un effet hyper-osmotique, entraînant une sortie d'eau et un « amaigrissement » de la pièce intermédiaire ; elle pourrait également être due à l'absence de colorant de fond. Avant la coloration, le SpermScan® comporte une étape de fixation. Le fixateur pourrait limiter la perte de gouttelettes cytoplasmiques due à un effet chimique de la coloration. Chez le bélier, la plupart des gouttelettes distales sont perdues sur les frottis colorés en comparaison à la préparation humide (Cameron, 1977).

Nous n'avons pas observé plus d'anomalies de la tête du spermatozoïde avec le SpermScan® qu'avec les deux autres colorations. Pourtant cela aurait pu être le cas sachant que le SpermScan® est une coloration totale supposée mettre en évidence

les différentes régions de la tête telle que l'acrosome. Dans notre étude, cette différenciation des différentes sections de la tête n'a été que rarement observée.

#### e. Effet du dilueur sur les résultats du spermocytogramme

L'utilisation du dilueur Bioxcell® diminue significativement la présence d'anomalies morphologiques avec la coloration Vita-Eosine®, mais aussi avec la coloration Sperm VitalStain®. Cette diminution est due à la faible fréquence des queues repliées lorsque la semence est diluée. La coloration SpermScan® est peu sensible à cet effet dilution.

La dilution est réalisée avant la coloration ; elle diminue l'effet hypo-osmotique de l'éosine discutée dans la partie précédente. Ceci pourrait être à l'origine de la diminution de l'artéfact « queue repliée ». L'absence de l'effet de la dilution lors de la coloration SpermScan® pourrait être due à l'absence d'hypotonie de cette coloration.

### 3. Limites et perspectives

La première limite de notre étude est le nombre restreint d'animaux utilisés. Notre effectif de 36 taureaux utilisés demeure faible par rapport à d'autres études portant sur la comparaison de méthode de coloration de semence (181 taureaux ont été utilisés dans l'étude de Sprecher et Coe (1996)). De plus, les résultats portent sur un nombre plus limité d'animaux dus aux aléas de l'expérimentation (23 taureaux pour la vitalité, 18 taureaux pour l'effet opérateur\*coloration et l'effet dilution\*coloration et 29 taureaux pour l'effet coloration). Un nombre plus élevé d'animaux aurait peut-être permis de mettre en évidence une différence significative entre les colorations Sperm VitalStain® et Vita-Eosine® concernant les anomalies morphologiques majeures (II.3.c. Etude sur les anomalies majeures et mineures).

Il serait préférable de réaliser ces comparaisons sur des taureaux sains pour diminuer la variabilité inter-individuelle et donc les écarts-types qui peuvent paraître importants dans notre étude. Un protocole intéressant serait de travailler sur le minimum d'éjaculats appartenant au même taureau. En effet, il existe des différences de spermogramme entre chaque éjaculat selon, par exemple, les conditions lors de la spermatogénèse qui s'est déroulée deux mois auparavant (voir III.1.a. Autres causes de dégénérescence testiculaire). Un éjaculat de taureau sain a un volume minimal de 3 ml. Pour chaque coloration, 50  $\mu$ L de sperme sont utilisés ; 3 ml de sperme permettrait de réaliser 20 frottis avec chacune des 3 colorations. Si l'on estime qu'un opérateur peut raisonnablement lire 240 frottis (216 frottis lus par opérateur dans notre expérience), 4 éjaculats d'un même taureau seraient nécessaires et permettraient de réaliser 80 lames de chaque coloration, soit 40 lames diluées et 40 non diluées.

Garder les colorants à une température de 28°C pourrait permettre d'éliminer une cause d'artéfacts. Cependant, la température optimale n'est pas précisée par le fabricant qui conseille d'utiliser le colorant à température ambiante.

Enfin, notre étude a confirmé l'existence d'un effet opérateur et le fait qu'il est souhaitable d'uniformiser les critères de lecture entre opérateurs novice et expérimenté. Le degré de repliement de la queue est un élément qui peut être facilement harmonisé entre opérateurs.

## CONCLUSION

Cette étude a eu pour but de comparer trois techniques de coloration de la semence de taureau (Vita-Eosine®, Sperm VitalStain® et Spermoscan®) pour l'évaluation de la vitalité (Vita-Eosine® et Sperm VitalStain®) et l'évaluation des anomalies morphologiques pour les trois colorations. Pour un opérateur expérimenté, la coloration Sperm VitalStain® semble la plus adaptée pour apprécier la vitalité des spermatozoïdes. Elle présente une étape de moins que la technique Vita-Eosine réduisant de ce fait le biais lié à la méthode de préparation. Elle limite également l'effet toxique de l'éosine seule. Le dilueur Bioxcell® ne doit pas être utilisé lors de l'évaluation de la vitalité des spermatozoïdes par une méthode de coloration vitale.

Concernant l'évaluation de la morphologie, les trois colorations montrent des résultats différents : La coloration Vita-Eosine® est associée à un nombre plus élevé de queues repliées pouvant être considéré comme un artéfact. La coloration Sperm VitalStain® est associée à un nombre plus élevé d'anomalies de pièce intermédiaire. La coloration Spermoscan® est associée au plus faible nombre d'anomalies avec une fréquence de queue repliée plus faible (anomalie considérée comme artéfactuelle). Cependant, la coloration Spermoscan® présente peu d'intérêt par rapport aux colorations vitales utilisées ; au contraire, cela allonge le temps de l'examen du fait d'une plus grande difficulté de lecture et ne permet pas l'évaluation de la vitalité. La coloration Sperm VitalStain® semble être le meilleur compromis entre praticité et exactitude (moins d'artéfacts que la coloration Vita-Eosine®, lecture aisée).

L'utilisation du dilueur Bioxcell® lors de l'évaluation des anomalies morphologiques montre une diminution de l'artéfact « queue repliée » lors de l'usage des colorations à base d'éosine-nigrosine.

Il est recommandé une méthode standard pour améliorer l'évaluation de la qualité de la semence (Björndahl et al., 2004 ; Root Kustritz et al., 1998 ; Brito et al., 2011). Cette méthode standard doit inclure le fait de diluer ou non l'échantillon de sperme avant coloration.

**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 **DECAUDIN Adeline** intitulée « **Comparaison de différentes méthodes de coloration de la semence bovine pour l'évaluation de la vitalité et des anomalies morphologiques des spermatozoïdes : colorations « Vita-Eosine », « Sperm VitalStain » et « SpermSCAN ».** et que cette dernière peut être imprimée en vue de sa soutenance.

Fait à Toulouse, le 26 mai 2016  
Professeur Xavier BERTHELOT  
Enseignant chercheur  
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

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



Vu :  
Le Président du jury :  
Professeur Louis BUJAN

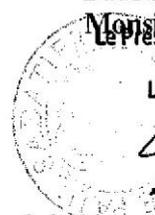
**Professeur Louis BUJAN**  
Directeur EA 3694  
Groupe de Recherche en Fertilité Humaine  
Université Toulouse III  
Hôpital Paul de Viguer - 330 av. Grande Bretagne  
31059 TOULOUSE cedex 9

Conformément à l'Arrêté du 20 avril 2007, article 6, la soutenance de la thèse ne peut être autorisée qu'après validation de l'année d'approfondissement.

Vu et autorisation de l'impression :  
Président de l'Université  
Paul Sabatier

Monsieur Jean-Pierre VINEL  
Le Président de l'Université Paul Sabatier  
par délégation.  
La Vice-Présidente de la CFVU

Régine ANDRE-OBRECHT



## **Bibliographie**

ALTEROCHE F. (2013). Le taureau reste au cœur des ébats. *Réussir bovin viande*, n° 204, pp. 20-31.

BARTH A.D. et WALDNER C.L. (2002). Factors affecting breeding soundness classification of beef bulls examined at the Western College of Veterinary Medicine. *The Canadian Veterinary Journal*, Vol. **43**, n° 4, pp. 274-284.

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

BJÖRNDAHL L., SÖDERLUND I. et KVIST U. (2003). Evaluation of the one-step eosin-nigrosin staining technique for human sperm vitality assessment. *Human Reproduction (Oxford, England)*, Vol. **18**, n° 4, pp. 813-816.

BRITO L.F.C., GREENE L.M., KELLEMAN A., KNOBBE M. et TURNER R. (2011). Effect of method and clinician on stallion sperm morphology evaluation. *Theriogenology*, Vol. **76**, n° 4, pp. 745-750.

CAMERON R.D. (1977). Semen collection and evaluation in the ram : The preparation of spermatozoa for morphological examination. *Australian Veterinary Journal*, Vol. **53**, n° 8, pp. 384-386.

CLERMONT Y. (1972). Kinetics of spermatogenesis in mammals : seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. *Physiological Reviews*, Vol. **52**, n° 1, pp. 198-236.

COOPER T.G. et HELLENKEMPER B. (2009). Method-related estimates of sperm vitality. *Journal of Andrology*, Vol. **30**, n° 3, pp. 214-218.

DERIVAUX J. (1958). Le mâle : Evaluation de la fertilité masculine. In : *Physiopathologie de la reproduction et insemination artificielle des animaux domestiques*. Liège : Societe A. Desoer, pp. 109-141.

DUMONT P. (1997). Appréciation de la fonction sexuelle du taureau reproducteur. *Le point vétérinaire*, Vol. **28**, n° 185, pp. 19-32.

ELIASSON R. (1977). Supravital staining of human spermatozoa. *Fertility and Sterility*, Vol. **28**, n° 11, pp. 1257.

EVERETT R.W. et BEAN B. (1982). Environmental influences on semen output. *Journal of Dairy Science*, Vol. **65**, n° 7, pp. 1303-1310.

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

- GUERIN V. (1997). *Contribution à l'évaluation du pouvoir fécondant du sperme de chien. Emploi d'un colorant de l'acrosome: le spermac®*. Thèse de doctorat vétérinaire, Lyon 1, 96 p.
- HANCOCK J.L. (1957). The morphology of boar spermatozoa. *The Journal of Microscopy*, Vol. **76**, n° 3, pp. 84-97.
- HOPKINS F.M. et SPITZER S. (1997). The new Society for Theriogenology breeding soundness evaluation system. *The Veterinary clinics of North America, Food animal practice*. Vol. **13**, n° 2, pp. 283-293.
- JANETT F., KEO S., BOLLWEIN H., HÄSSIG M. et THUN R. (2005). Comparison of AndroMed®, Bioxcell® and Triladyl® extender for cryopreservation of bull semen. *Schweiz Arch Tierheilk*. Vol. **147**, pp. 62.
- KUMI-DIAKA J., WILSON S., SANUSI A., NJOKU C.E. et OSORI D.I. (1981). Bovine besnoitiosis and its effect on the male reproductive system. *Theriogenology*, Vol. **16**, n° 5, pp. 523-530.
- KUSTER C.E., SINGER R.S. et ALTHOUSE G.C. (2004). Determining sample size for the morphological assessment of sperm. *Theriogenology*, Vol. **61**, n° 4, pp. 691-703.
- LESTER L. et LARSON L.L. (1986). Examination of the reproductive system of the bull. In Morrow D.A. (ed) : *Current therapy in theriogenology: diagnosis, treatment and prevention of reproduction diseases in small and large animals*. 2e édition. Philadelphia : W.B. Saunders Company, pp. 101-116.
- LIU Z. et FOOTE R.H. (1998). Bull Sperm Motility and Membrane Integrity in Media Varying in Osmolality. *Journal of Dairy Science*, Vol. **81**, n° 7, pp. 1868-1873.
- ŁUKASZEWICZ E., JERYSZ A., PARTYKA A. et SIUDZIŃSKA A. (2008). Efficacy of evaluation of rooster sperm morphology using different staining methods. *Research in Veterinary Science*, Vol. **85**, n° 3, pp. 583-588.
- MARTÍNEZ A.I.P. (2004). Canine fresh and cryopreserved semen evaluation. *Animal Reproduction Science*, Vol. **82-83**, pp. 209-224.
- MATHEVON M., BUHR M.M. et DEKKERS J.C. (1998). Environmental, management, and genetic factors affecting semen production in Holstein bulls. *Journal of Dairy Science*, Vol. **81**, n° 12, pp. 3321-3330.
- 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. *Journal of Animal Science*, Vol. **10**, n°1, pp. 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. *Canadian Journal of Veterinary Research*, Vol. **75**, n° 4, pp. 241-247.

MESCHEDE D., KECK C., ZANDER M., COOPER T.G., YEUNG C.H. et NIESCHLAG E. (1993). Influence of three different preparation techniques on the results of human sperm morphology analysis. *International Journal of Andrology*, Vol. **16**, n° 6, pp. 362-369.

ORTAVANT R., DUPONT S., PAUTHE H. et ROUSSEL G. (1952). Contribution à l'étude de la différenciation des spermatozoïdes morts et des spermatozoïdes vivants dans le sperme de taureau. *Annales de zootechnie*, Vol. **1**, n°1, pp. 5-12.

PALMER C.W., BRITO L.F.C., ARTEAGA A.A., SÖDERQUIST L., PERSSON Y. et BARTH A.D. (2005). Comparison of electroejaculation and transrectal massage for semen collection in range and yearling feedlot beef bulls. *Animal Reproduction Science*, Vol. **87**, n° 1-2, pp. 25-31.

RIGAL F. (2008). *Comparaison de la qualité de la semence de taureaux collectés à l'électro-éjaculateur ou au vagin artificiel*. Thèse de doctorat vétérinaire, Toulouse 3, 99 p.

ROOT KUSTRITZ M.V., OLSON P.N., JOHNSTON S.D., et ROOT T.K. (1998). The effects of stains and investigators on assessment of morphology of canine spermatozoa. *Journal of the American Animal Hospital Association*, Vol. **34**, n° 4, pp. 348-352.

SPRECHER D.J. et COE P.H. (1996). Differences in bull spermograms using eosin-nigrosin stain, feulgen stain, and phase contrast microscopy methods. *Theriogenology*, Vol. **45**, n° 4, pp. 757-764.

WAY A.L., HENAULT M.A. et KILLIAN G.J. (1995). Comparison of four staining methods for evaluating acrosome status and viability of ejaculated and cauda epididymal bull spermatozoa. *Theriogenology*, Vol. **43**, n° 8, pp. 1301-1316.

## ANNEXES

### Annexe I : Valeurs de référence du spermogramme du taureau de monte naturelle

Tableau 16 : Valeurs de référence du spermogramme du taureau de monte naturelle  
(Hopkins et Spitzer, 1997)

Paramètres	Normes
Volume	3 à 8 ml
Couleur	Blanc laiteux à jaunâtre
Consistance	Laitieuse à crémeuse
Motilité massale	> 2
Motilité individuelle	> 30 à 40 %
Concentration (milliards/ml)	> 0.3
Pourcentage de morts	< 40 %
Pourcentage d'anomalies	< 30% (< 20% d'anomalies de tête)

## **Annexe II : Données brutes du nombre de spermatozoïdes morts et du nombre d'anomalies morphologiques sur 200 spermatozoïdes comptés**

Tableau 17 : Données brutes du nombre de spermatozoïdes morts sur 200 spermatozoïdes comptés et de la motilité individuelle (%) de chaque taureau (n = 23) en fonction de la coloration, de l'opérateur et de la dilution

Coloration : 1 = Vita-Eosine®, 2 = Sperm VitalStain® ;

Opérateur : 1 = expérimenté, 2 = novice ;

Dilution : 0 = non dilué, 1 = dilué

Taureau	Dilution	Coloration	Opérateur	Motilité individuelle	Morts
1	0	1	1	35	187
1	1	1	1	35	200
1	0	1	2	35	143
1	1	1	2	35	200
1	0	2	1	35	72
1	1	2	1	35	200
1	0	2	2	35	80
1	1	2	2	35	112
2	0	1	1	60	26
2	1	1	1	60	200
2	0	1	2	60	97
2	1	1	2	60	200
2	0	2	1	60	106
2	1	2	1	60	200
2	0	2	2	60	46
2	1	2	2	60	47
3	0	1	1	60	147
3	1	1	1	60	200
3	0	1	2	60	184
3	1	1	2	60	200
3	0	2	1	60	54
3	1	2	1	60	200
3	0	2	2	60	65
3	1	2	2	60	67
4	0	1	1	44	96
4	1	1	1	44	200
4	0	1	2	44	89
4	1	1	2	44	200
4	0	2	1	44	45
4	1	2	1	44	200
4	0	2	2	44	55
4	1	2	2	44	70
5	0	1	1	52	167
5	1	1	1	52	200
5	0	1	2	52	159
5	1	1	2	52	200
5	0	2	1	52	32
5	1	2	1	52	200
5	0	2	2	52	40
5	1	2	2	52	160
6	1	1	1	20	136
6	0	1	2	20	140
6	1	1	2	20	112
6	0	2	1	20	136
6	1	2	1	20	114
6	0	2	2	20	135
6	1	2	2	20	161
7	0	1	1	75	200
7	1	1	1	75	187
7	0	1	2	75	162
7	1	1	2	75	165
7	0	2	1	75	200
7	1	2	1	75	197
7	0	2	2	75	165
7	1	2	2	75	125
10	0	1	1	66	136
10	1	1	1	66	200
10	0	1	2	66	123
10	1	1	2	66	200
10	0	2	1	66	38
10	1	2	1	66	200
10	0	2	2	66	166
10	1	2	2	66	81
11	0	1	1	66	180
11	1	1	1	66	176
11	0	1	2	66	159
11	1	1	2	66	147
11	0	2	1	66	126
11	1	2	1	66	116
11	0	2	2	66	117
11	1	2	2	66	138
12	0	1	1	75	130
12	1	1	1	75	200
12	0	1	2	75	129
12	1	1	2	75	200
12	0	2	1	75	45
12	1	2	1	75	200
12	0	2	2	75	54
12	1	2	2	75	81
13	0	1	1	80	158
13	1	1	1	80	162
13	0	1	2	80	114
13	1	1	2	80	144
13	0	2	1	80	74
13	1	2	1	80	28
13	0	2	2	80	58
13	1	2	2	80	45
18	0	1	1	75	100
18	1	1	1	75	200
18	0	1	2	75	145
18	1	1	2	75	200
18	0	2	1	75	50
18	1	2	1	75	200
18	0	2	2	75	62
18	1	2	2	75	158
21	0	1	1	75	136
21	1	1	1	75	145
21	0	1	2	75	100
21	1	1	2	75	119
21	0	2	1	75	74
21	1	2	1	75	53
21	0	2	2	75	80
21	1	2	2	75	74
23	0	1	1	75	200
23	1	1	1	75	120
23	0	1	2	75	200
23	1	1	2	75	95
23	0	2	1	75	200
23	1	2	1	75	200
23	0	2	2	75	200
23	1	2	2	75	121
24	0	1	1	50	147
24	1	1	1	50	200
24	0	1	2	50	95
24	1	1	2	50	200
24	0	2	1	50	50
24	1	2	1	50	200
24	0	2	2	50	72
24	1	2	2	50	103
25	0	1	1	50	150

Taureau	Dilution	Coloration	Opérateur	Motilité individuelle	Morts
25	0	1	1	50	150
25	1	1	1	50	200
25	0	1	2	50	116
25	1	1	2	50	200
25	0	2	1	50	95
25	1	2	1	50	200
25	0	2	2	50	107
25	1	2	2	50	110
26	0	1	1	50	168
26	1	1	1	50	200
26	0	1	2	50	113
26	1	1	2	50	174
26	0	2	1	50	63
26	1	2	1	50	200
26	0	2	2	50	90
26	1	2	2	50	117
27	0	1	1	75	152
27	1	1	1	75	200
27	0	1	2	75	89
27	1	1	2	75	200
27	0	2	1	75	30
27	1	2	1	75	200
27	0	2	2	75	50
27	1	2	2	75	88
29	0	1	1	40	184
29	1	1	1	40	200
29	0	1	2	40	159
29	1	1	2	40	200
29	0	2	1	40	43
29	1	2	1	40	200
29	0	2	2	40	45
29	1	2	2	40	47
31	0	1	1	60	166
31	1	1	1	60	200
31	0	1	2	60	143
31	1	1	2	60	200
31	0	2	1	60	60
31	1	2	1	60	200
31	0	2	2	60	63
31	1	2	2	60	154
32	0	1	1	20	177
32	1	1	1	20	200
32	0	1	2	20	162

Taureau	Dilution	Coloration	Opérateur	Motilité individuelle	Morts
32	1	1	2	20	200
32	0	2	1	20	108
32	1	2	1	20	200
32	0	2	2	20	104
32	1	2	2	20	150
33	0	1	1	25	158
33	1	1	1	25	200
33	0	1	2	25	146
33	1	1	2	25	200
33	0	2	1	25	101
33	1	2	1	25	200
33	0	2	2	25	112
33	1	2	2	25	127
34	0	1	1	60	154
34	1	1	1	60	200
34	0	1	2	60	117
34	1	1	2	60	200
34	0	2	1	60	32
34	1	2	1	60	200
34	0	2	2	60	15
34	1	2	2	60	131

Tableau 18 : Données brutes des relevés d'anomalies morphologiques dénombrées sur 200 spermatozoïdes de chaque taureau (n = 36)

X = lames appartenant aux 18 jeux de lames analysés pour l'interaction coloration\*dilution et coloration\*opérateur

\* = lames appartenant aux 23 jeux de lames comparant Vita-Eosine®/Sperm VitalStain®

■ = lames appartenant aux 29 jeux de lames utilisés pour l'étude de l'effet de la coloration

Coloration : 1 = Vita-Eosine®, 2 = Sperm VitalStain®, 3 = SpermSCAN® ;

Opérateur : 1 = expérimenté, 2 = novice ; Dilution : 0 = non dilué, 1 = dilué

Taureau X	Dilution	Coloration	Opérateur	Anomalies	Tête	Tête Seule	Tête Déformée	Tête Repliée	Pièce Intermédiaire	PI Gouttelette Proximale	PI Gouttelette Distale	PI Déformée	PI Repliée	Queue	Queue repliée	Queue enroulée prox	Queue enroulée dist	Queue courte	Majeures	mineures
1*	0	1	1	13	4	1	3	0	0	0	0	0	0	9	8	0	1	0	3	10
1*	0	1	2	29	9	2	6	1	3	0	0	3	0	17	11	0	6	0	6	33
1*	1	1	1	11	5	2	3	0	1	0	0	1	0	10	4	6	0	0	7	4
1*	1	1	2	22	16	8	8	0	0	0	0	0	0	6	5	1	0	0	9	13
1*	0	2	1	35	15	6	7	2	9	2	3	4	0	11	3	4	4	0	17	18
1*	0	2	2	49	9	2	7	0	9	2	1	6	0	31	22	5	4	0	17	32
1*	1	2	1	15	10	1	8	1	0	0	0	0	0	5	2	1	2	0	9	6
1*	1	2	2	43	7	0	7	0	7	4	1	2	0	29	21	0	8	0	13	30
1	0	3	1	12	8	2	6	0	2	0	0	1	1	2	1	1	0	0	9	3
1	0	3	2	22	16	8	8	0	1	1	0	0	0	5	5	0	0	0	8	14
1	1	3	1	18	11	1	10	0	1	0	0	1	0	6	5	1	0	0	12	6
1	1	3	2	63	17	4	13	0	1	1	0	0	0	45	38	0	0	7	14	49
2*	0	1	1	112	12	4	6	2	1	0	0	0	1	99	90	4	3	2	11	101
2*	0	1	2	123	22	15	6	1	6	0	0	5	1	95	64	20	11	0	28	95
2*	1	1	1	36	17	9	8	0	0	0	0	0	0	19	4	14	0	1	22	14
2*	1	1	2	44	20	10	8	2	1	1	0	0	0	23	17	5	1	0	14	30
2*	0	2	1	41	15	3	11	1	17	2	7	8	0	9	4	5	0	0	26	15
2*	0	2	2	67	26	10	16	0	8	0	0	8	0	33	12	19	2	0	41	26
2*	1	2	1	40	20	7	12	1	13	1	7	5	0	7	2	4	0	1	22	18
2*	1	2	2	51	17	7	9	1	9	0	1	8	0	25	16	7	1	1	24	27
2	0	3	1	41	29	6	20	3	2	0	0	2	0	10	7	2	0	1	24	17
2	0	3	2	44	25	15	10	0	1	0	0	1	0	18	13	4	1	0	12	32
2	1	3	1	20	15	8	6	1	0	0	0	0	0	5	2	3	0	0	9	11
2	1	3	2	70	48	40	7	1	1	0	0	1	0	21	12	4	0	5	12	58
3*	0	1	1	48	8	2	5	1	1	1	0	0	0	39	33	6	0	0	12	36
3*	0	1	2	40	14	9	3	1	2	2	0	0	0	24	15	7	2	0	13	27
3*	1	1	1	30	6	3	3	0	3	0	0	3	0	21	18	2	1	0	8	22
3*	1	1	2	27	9	3	3	3	1	0	0	1	0	17	15	2	0	0	6	21
3*	0	2	1	27	7	2	5	0	8	2	2	2	1	12	10	2	0	0	13	14
3*	0	2	2	70	19	5	11	2	2	0	0	2	0	49	31	10	8	0	17	53
3*	1	2	1	31	4	1	3	0	8	0	2	6	0	19	18	1	0	0	10	21
3*	1	2	2	58	6	2	4	0	5	2	3	0	0	47	29	14	4	0	20	38
3	0	3	1	33	14	3	11	0	3	1	1	1	0	16	13	2	1	0	15	18
3	0	3	2	73	15	4	11	0	1	0	0	1	0	57	31	20	6	0	31	42
3	1	3	1	32	6	1	5	0	2	0	0	2	0	24	23	0	1	0	7	25
3	1	3	2	68	5	2	3	0	1	0	0	1	0	62	55	7	0	0	11	57
4*	0	1	1	86	32	22	10	0	4	3	0	0	1	50	37	11	1	1	25	61
4*	0	1	2	112	53	49	3	1	4	2	0	0	2	55	37	14	4	0	20	92
4*	1	1	1	36	24	22	2	0	2	0	0	2	0	10	8	2	0	0	6	30
4*	1	1	2	51	30	28	2	0	2	2	0	0	0	19	16	3	0	0	7	44
4*	0	2	1	64	37	29	8	0	7	1	0	6	0	20	9	9	2	0	24	40

Taureau X	Dilution	Coloration	Opérateur	Anomalies	Tête	Tête Seule	Tête Déformée	Tête Repliée	Pièce Intermédiaire	PI Gouttelette Proximale	PI Gouttelette Distale	PI Déformée	PI Repliée	Queue	Queue repliée	Queue enroulée prox	Queue enroulée dist	Queue courte	Majeures	mineures
4*	0	2	2	58	62	53	9	0	5	0	0	4	1	69	36	24	9	0	20	38
4*	1	2	1	40	22	16	6	0	2	2	0	0	0	16	8	6	0	2	14	26
4*	1	2	2	90	38	34	3	1	10	7	0	3	0	42	29	12	1	0	25	65
4	0	3	1	54	36	28	8	0	3	0	0	3	0	15	4	7	0	4	18	36
4	0	3	2	111	41	34	7	0	0	0	0	0	0	70	15	30	25	0	37	74
4	1	3	1	64	50	34	16	0	2	0	0	0	2	12	8	4	0	0	22	42
4	1	3	2	68	49	46	3	0	1	1	0	0	0	18	16	2	0	0	6	62
5*	0	1	1	53	2	2	0	0	0	0	0	0	0	51	35	6	10	0	6	47
5*	0	1	2	67	9	5	4	0	3	0	0	3	0	55	37	10	8	0	17	50
5*	1	1	1	12	4	0	4	0	0	0	0	0	0	8	6	1	1	0	5	7
5*	1	1	2	38	3	1	1	1	2	1	0	1	0	33	31	2	0	0	5	33
5*	0	2	1	11	6	2	4	0	1	1	0	0	0	4	3	1	0	0	6	5
5*	0	2	2	70	16	5	9	2	2	0	0	2	0	52	44	3	5	0	12	58
5*	1	2	1	8	3	0	3	0	2	0	2	0	0	3	3	0	0	0	3	5
5*	1	2	2	24	8	2	5	1	4	3	0	1	0	12	7	0	3	2	9	15
5	0	3	1	19	13	4	9	0	1	0	1	0	0	5	4	1	0	0	10	9
5	0	3	2	63	9	1	8	0	1	0	0	0	1	53	44	9	0	0	15	48
5	1	3	1	19	11	3	8	0	1	0	0	1	0	7	7	0	0	0	9	10
5	1	3	2	47	10	3	7	0	1	1	0	0	0	36	31	4	0	0	12	35
6*	0	1	1	74	4	4	0	0	0	0	0	0	0	70	60	2	8	0	2	72
6*	0	1	2	79	2	1	1	0	3	0	0	3	0	74	66	2	6	0	6	73
6*	1	1	1	76	4	2	2	0	0	0	0	0	0	72	64	2	6	0	4	72
6*	1	1	2	69	3	2	1	0	2	0	0	2	0	64	54	3	7	0	6	63
6*	0	2	1	72	1	1	0	0	7	0	0	7	0	64	54	3	6	1	10	62
6*	0	2	2	86	5	3	2	0	2	0	0	2	0	79	57	9	13	0	12	74
6*	1	2	1	64	2	1	0	0	4	0	0	4	0	58	44	4	6	4	8	56
6*	1	2	2	84	11	11	0	0	3	0	0	3	0	70	58	3	6	3	6	78
6	0	3	2	72	10	9	1	0	2	0	0	1	1	60	55	3	2	0	6	66
6	1	3	1	26	6	4	2	0	0	0	0	0	0	20	20	0	0	0	2	24
6	1	3	2	70	6	5	1	0	2	0	0	2	0	62	49	10	3	0	13	57
7*	0	1	1	14	4	4	0	0	0	0	0	0	0	10	4	4	0	2	4	10
7*	0	1	2	32	10	5	5	0	6	0	0	5	1	16	8	6	1	0	12	20
7*	1	1	1	10	4	4	0	0	2	0	0	2	0	4	2	0	2	0	2	8
7*	1	1	2	33	9	7	2	0	3	0	0	3	0	21	14	0	7	0	5	28
7*	0	2	1	6	0	0	0	0	2	0	0	2	0	4	2	2	0	0	4	2
7*	0	2	2	35	6	5	1	0	5	0	0	5	0	24	16	4	4	0	10	25
7*	1	2	1	20	6	3	3	0	9	2	0	7	0	5	1	4	0	0	16	4
7*	1	2	2	20	3	3	0	0	6	2	0	4	0	11	8	3	0	0	9	11
7	0	3	2	86	14	10	3	1	1	0	0	1	0	71	54	10	6	1	13	73
7	1	3	1	25	17	4	2	11	3	1	0	2	0	5	4	1	0	0	6	19
7	1	3	2	69	12	11	1	0	0	0	0	0	0	57	43	10	4	0	11	58
8	0	1	1	40	4	4	0	0	4	0	0	3	1	32	27	5	0	0	9	31
8	0	1	2	41	14	4	10	0	2	0	0	2	0	25	16	7	2	0	14	27
8	1	1	2	68	16	8	4	4	4	0	0	4	0	48	20	0	28	0	8	60
8	0	2	1	145	9	3	6	0	127	8	88	16	0	9	8	1	0	0	14	129
8	0	2	2	72	11	5	4	2	7	0	0	7	0	54	27	20	7	0	30	42
8	1	2	1	74	9	4	5	0	56	0	52	0	4	9	3	4	2	0	19	55
8	1	2	2	60	8	2	2	4	23	0	20	3	0	29	13	10	5	1	15	45
8	0	3	1	28	6	4	2	0	12	4	0	8	0	10	4	6	0	0	20	8
8	0	3	2	76	17	7	8	2	1	0	0	1	0	58	32	20	6	0	24	53
8	1	3	1	33	5	2	3	0	23	0	22	1	0	5	0	5	0	0	9	24
8	1	3	2	91	3	3	0	0	15	3	10	2	0	73	37	27	9	0	32	59

Taureau X	Dilution	Coloration	Opérateur	Anomalies	Tête	Tête Seule	Tête Déformée	Tête Repliée	Pièce Intermédiaire	PI Gouttelette Proximale	PI Gouttelette Distale	PI Déformée	PI Repliée	Queue	Queue repliée	Queue enroulée prox	Queue enroulée dist	Queue courte	Majeures	mineures
9	0	1	1	39	11	8	3	0	5	4	0	1	0	23	23	0	0	0	8	31
9	0	1	2	49	14	9	4	1	3	0	0	3	0	32	23	4	5	0	8	41
9	0	2	1	31	11	5	6	0	8	2	4	2	0	12	9	3	0	0	13	18
9	0	2	2	84	9	4	5	0	13	1	0	11	1	62	28	30	4	0	46	38
9	0	3	1	12	2	2	0	0	4	2	1	1	0	6	5	1	0	0	4	8
9	0	3	2	38	9	4	5	0	4	0	0	4	0	25	16	9	0	0	17	21
10*	0	1	1	54	6	4	0	2	1	1	0	0	0	47	40	7	0	0	8	46
10*	0	1	2	113	24	16	5	3	1	0	0	1	0	88	55	20	13	0	22	91
10*	1	1	1	36	12	10	2	0	6	0	0	0	6	18	6	0	12	0	8	28
10*	1	1	2	52	17	12	3	2	4	0	0	4	0	31	22	0	8	1	6	46
10*	0	2	1	24	4	2	2	0	4	0	0	4	0	8	2	6	0	0	18	6
10*	0	2	2	61	20	13	6	1	14	9	5	0	0	27	19	6	2	0	16	45
10*	1	2	1	33	10	6	4	0	17	4	3	10	0	6	3	3	0	0	21	12
10*	1	2	2	71	20	17	0	3	28	23	5	0	0	23	11	8	4	0	31	40
10	0	3	1	26	16	6	4	6	0	0	0	0	0	10	10	0	0	0	4	22
10	0	3	2	69	36	26	8	2	3	0	0	3	0	30	14	13	2	1	17	52
10	1	3	1	22	13	8	4	1	1	0	0	1	0	8	6	2	0	0	7	15
10	1	3	2	55	26	20	6	0	1	1	0	0	0	28	22	6	0	0	13	42
11*	0	1	1	52	8	2	2	4	6	4	0	0	2	38	32	2	0	4	10	42
11*	0	1	2	70	21	16	5	0	4	0	0	3	1	45	35	5	2	3	11	59
11*	1	1	1	36	18	10	7	1	1	0	0	1	0	17	14	1	1	1	9	27
11*	1	1	2	45	13	11	1	1	2	0	0	2	0	30	24	0	4	2	3	42
11*	0	2	1	19	7	4	3	0	6	1	1	2	2	6	5	1	0	0	9	10
11*	0	2	2	29	13	6	7	0	0	0	0	0	0	16	14	2	0	0	5	24
11*	1	2	1	20	9	5	1	3	2	0	2	0	0	9	4	1	4	0	2	18
11*	1	2	2	43	13	12	1	0	2	0	2	0	0	28	23	3	1	1	4	39
11	0	3	2	16	8	6	2	0	0	0	0	0	0	8	7	1	0	0	2	14
11	1	3	1	13	4	4	0	0	0	0	0	0	0	9	7	2	0	0	2	11
11	1	3	2	52	10	8	2	0	0	0	0	0	0	42	37	4	0	1	5	47
12*	0	1	1	22	2	1	1	0	3	2	0	1	0	17	14	0	3	0	4	18
12*	0	1	2	57	25	16	8	1	5	1	0	4	0	27	16	7	2	2	13	44
12*	1	1	1	15	9	6	1	2	1	0	0	1	0	5	4	0	1	0	2	13
12*	1	1	2	34	10	8	0	2	3	0	0	2	1	21	17	0	4	0	3	31
12*	0	2	1	17	8	4	3	1	6	0	4	2	0	3	0	2	1	0	7	10
12*	0	2	2	50	14	12	2	0	1	0	1	0	0	35	21	8	6	0	8	42
12*	1	2	1	18	6	5	1	0	5	1	3	1	0	7	3	2	2	0	5	13
12*	1	2	2	62	14	14	0	0	19	5	12	2	0	29	13	4	12	0	11	51
12	0	3	1	16	7	4	1	2	2	0	2	0	0	7	5	1	1	0	2	14
12	0	3	2	57	15	14	1	0	3	0	0	2	1	39	19	10	10	0	13	44
12	1	3	1	17	13	11	2	0	0	0	0	0	0	4	3	1	0	0	3	14
12	1	3	2	56	13	13	0	0	2	1	0	1	0	41	29	11	0	1	13	34
13*	0	1	1	21	9	7	2	0	4	1	0	2	1	8	5	2	1	0	8	13
13*	0	1	2	65	10	3	7	0	2	0	0	2	0	53	25	18	10	0	25	40
13*	1	1	1	52	6	0	6	0	6	0	6	0	0	40	22	2	16	0	8	44
13*	1	1	2	45	5	3	2	0	6	2	3	1	0	34	20	10	4	0	15	30
13*	0	2	1	43	14	11	3	0	12	3	3	6	0	17	2	1	13	1	13	30
13*	0	2	2	82	15	11	3	1	4	0	0	3	1	63	37	6	20	0	11	72
13*	1	2	1	30	4	4	0	0	20	8	6	4	2	6	2	0	4	0	14	16
13*	1	2	2	64	7	5	0	2	2	0	0	2	0	55	29	1	24	1	3	61
13	0	3	1	8	2	0	2	0	3	2	0	0	1	3	3	0	0	0	5	3
13	0	3	2	61	8	3	3	2	1	0	0	1	0	52	14	26	12	0	28	33
13	1	3	1	12	8	6	2	0	2	0	0	0	2	2	0	2	0	0	6	6

Taureau X	Dilution	Coloration	Opérateur	Anomalies	Tête	Tête Seule	Tête Déformée	Tête Replée	Pièce Intermédiaire	PI Gouttelette Proximale	PI Gouttelette Distale	PI Déformée	PI Replée	Queue	Queue repliée	Queue enroulée prox	Queue enroulée dist	Queue courte	Majeures	mineures
13	1	3	2	99	6	5	0	1	0	0	0	0	0	93	46	37	10	0	37	62
14	0	1	1	61	23	14	9	0	4	2	0	2	0	34	0	24	10	0	37	24
14	0	1	2	79	31	9	22	0	7	0	0	7	0	41	23	10	8	0	39	40
14	0	2	1	38	21	18	3	0	7	1	1	5	0	10	0	4	6	0	13	25
14	0	2	2	85	44	32	12	0	8	1	0	7	0	33	19	8	6	0	27	58
14	0	3	1	24	12	8	4	0	4	0	0	4	0	8	0	8	0	0	16	8
14	0	3	2	96	49	27	22	0	3	0	0	3	0	44	16	26	2	0	49	47
15	0	1	1	56	2	1	1	0	0	0	0	0	0	53	40	7	6	0	2	47
15	0	1	1	40	4	2	2	0	0	0	0	0	0	36	24	4	8	0	6	34
15	0	1	2	53	7	5	0	2	4	2	0	2	0	42	21	11	10	0	15	38
15	0	1	2	91	7	3	4	0	3	0	0	3	0	81	54	7	20	0	14	77
15	0	2	1	28	8	7	1	0	8	1	4	3	0	12	8	2	2	0	7	21
15	0	2	1	30	4	0	4	0	12	4	8	0	0	14	10	4	0	0	12	18
15	0	2	2	62	11	7	3	1	10	1	0	8	1	41	31	5	5	0	16	46
15	0	2	2	80	11	10	1	0	5	2	3	0	0	64	49	10	4	1	13	67
15	0	3	1	28	7	4	3	0	0	0	0	0	0	21	14	5	2	0	8	10
15	0	3	1	10	6	4	2	0	0	0	0	0	0	4	4	0	0	0	2	8
15	0	3	2	91	16	10	6	0	3	0	0	3	0	72	40	15	16	1	22	69
15	0	3	2	60	15	8	6	1	1	0	0	0	1	44	28	12	4	0	19	41
16	1	1	1	26	20	18	2	0	2	0	2	0	0	4	4	0	0	0	2	24
16	1	1	1	36	10	10	0	0	10	0	10	0	0	16	12	2	2	0	2	34
16	1	1	2	63	22	22	0	0	2	0	1	1	0	39	29	1	9	0	2	61
16	1	1	2	63	35	29	6	0	1	0	1	0	0	27	20	3	4	0	5	58
16	1	2	1	33	10	8	1	1	22	1	21	0	0	1	1	0	0	0	2	31
16	1	2	1	84	38	36	2	0	28	2	24	2	0	18	14	4	0	0	10	74
16	1	2	2	69	35	33	2	0	13	1	6	6	0	21	18	3	0	0	12	57
16	1	2	2	55	10	10	0	0	24	2	21	1	0	21	18	3	0	0	6	49
16	1	3	1	17	14	11	1	2	1	0	0	1	0	2	1	1	0	0	3	14
16	1	3	1	14	10	4	6	0	2	0	0	0	2	2	2	0	0	0	8	6
16	1	3	2	92	54	44	10	0	0	0	0	0	0	38	29	9	0	0	17	75
16	1	3	2	74	22	19	3	0	3	1	1	0	1	49	47	2	0	0	7	67
17	0	1	1	70	26	26	0	0	4	0	0	4	0	40	30	6	0	4	10	60
17	0	1	1	20	10	6	4	0	0	0	0	0	0	10	8	2	0	0	6	14
17	0	1	2	41	16	11	5	0	1	0	0	1	0	24	18	6	0	0	7	34
17	0	1	2	52	12	11	1	0	2	0	0	2	0	38	26	9	1	2	12	40
17	0	2	1	38	14	14	0	0	4	0	2	2	0	20	14	6	0	0	8	30
17	0	2	1	16	2	2	0	0	4	2	0	0	2	10	10	0	0	0	4	12
17	0	2	2	58	12	9	3	0	1	0	0	1	0	45	34	8	3	0	10	48
17	0	2	2	47	16	16	0	0	4	0	0	4	0	27	15	11	0	1	15	32
17	0	3	1	30	14	8	0	6	2	0	0	2	0	14	14	0	0	0	2	28
17	0	3	1	18	16	8	8	0	0	0	0	0	0	2	0	0	2	0	8	10
17	0	3	2	80	22	21	1	0	1	0	0	1	0	57	40	16	1	0	18	62
17	0	3	2	69	24	22	2	0	0	0	0	0	0	45	33	9	2	1	11	58
18*	0	1	1	64	18	18	0	0	0	0	0	0	0	46	46	0	0	0	0	64
18*	0	1	2	113	25	24	1	0	1	0	0	1	0	87	82	5	0	0	7	106
18*	1	1	1	24	12	10	2	0	0	0	0	0	0	12	12	0	0	0	2	22
18*	1	1	2	25	9	8	1	0	0	0	0	0	0	16	12	4	0	0	4	21
18*	0	2	1	26	12	10	2	0	8	2	4	2	0	6	4	2	0	0	8	18
18*	0	2	2	75	31	28	3	0	3	0	0	3	0	41	30	9	2	0	12	63
18*	1	2	1	24	12	10	2	0	0	0	0	0	0	12	12	0	0	0	2	22
18*	1	2	2	38	16	14	2	0	6	2	0	4	0	16	12	0	4	0	8	30
18	0	3	1	18	14	14	0	0	0	0	0	0	0	4	2	2	0	0	2	16

Taureau X	Dilution	Coloration	Opérateur	Anomalies	Tête	Tête Seule	Tête Déformée	Tête Repliée	Pièce Intermédiaire	PI Gouttelette Proximale	PI Gouttelette Distale	PI Déformée	PI Repliée	Queue	Queue repliée	Queue enroulée prox	Queue enroulée dist	Queue courte	Majeures	mineures
18	0	3	2	51	19	17	2	0	0	0	0	0	0	32	13	10	8	1	11	40
18	1	3	1	18	10	10	0	0	8	0	0	0	8	0	0	0	0	0	8	10
18	1	3	2	52	24	23	1	0	4	2	0	2	0	24	24	0	0	0	5	47
19	0	1	1	36	20	14	0	6	2	0	0	2	0	14	14	0	0	0	2	34
19	0	1	1	12	2	2	0	0	3	1	0	1	1	7	7	0	0	0	3	9
19	0	1	2	23	7	5	1	1	1	0	0	1	0	15	13	0	0	2	1	22
19	0	1	2	38	11	2	9	0	2	0	0	1	1	25	20	0	4	1	4	34
19	0	2	1	12	10	6	0	4	0	0	0	0	0	2	2	0	0	0	0	12
19	0	2	1	19	8	7	1	0	7	0	0	3	4	4	1	3	0	0	11	8
19	0	2	2	43	10	7	3	0	5	0	0	5	0	28	16	10	2	0	15	28
19	0	2	2	37	24	24	0	0	3	2	0	0	1	10	6	0	3	1	3	34
19	0	3	1	14	12	10	0	2	0	0	0	0	0	2	2	0	0	0	0	14
19	0	3	1	4	4	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2
19	0	3	2	61	14	9	5	0	2	0	0	2	0	45	31	7	7	0	13	48
19	0	3	2	40	8	7	1	0	3	1	2	0	0	29	28	1	0	0	3	37
20	0	1	1	78	50	20	18	12	10	4	0	6	0	18	2	16	0	0	44	34
20	0	1	2	62	41	19	22	0	10	2	0	8	0	11	6	5	0	0	37	25
20	0	2	1	98	48	34	10	4	36	29	10	6	0	14	8	6	0	0	42	56
20	0	2	2	127	80	19	61	0	19	3	1	15	0	28	16	0	12	0	71	56
20	0	3	1	84	62	46	12	4	6	2	4	0	0	16	6	8	0	2	22	62
20	0	3	2	131	85	51	33	1	12	3	0	9	0	34	17	9	8	0	53	78
21*	0	1	1	140	22	8	10	4	4	2	0	0	2	114	58	8	48	0	22	118
21*	0	1	2	108	5	3	1	1	4	0	0	4	0	99	61	7	30	0	11	97
21*	1	1	1	85	7	4	3	0	5	2	0	3	0	73	50	8	15	0	16	69
21*	1	1	2	69	8	7	1	0	5	1	0	4	0	56	22	4	30	0	10	59
21*	0	2	1	50	20	4	6	0	16	6	2	8	0	14	8	4	2	0	30	20
21*	0	2	2	63	13	7	6	0	15	1	0	14	0	35	28	5	2	0	23	40
21*	1	2	1	46	12	5	7	0	21	8	3	10	0	13	6	7	0	0	32	14
21*	1	2	2	45	11	8	3	0	12	4	2	6	0	22	14	5	2	1	18	27
21	0	3	1	26	16	2	12	2	4	0	0	4	0	6	4	2	0	0	18	8
21	0	3	2	34	13	3	7	3	4	0	0	2	2	17	11	6	0	0	15	19
21	1	3	1	21	3	1	2	0	6	0	0	6	0	12	10	1	1	0	9	12
21	1	3	2	51	10	8	0	2	2	1	0	1	0	39	33	6	0	0	8	43
22	1	1	1	13	7	7	0	0	3	1	0	2	0	3	2	1	0	0	3	10
22	1	1	2	15	7	2	4	1	0	0	0	0	0	8	5	0	3	0	3	12
22	0	2	1	12	8	6	2	0	0	0	0	0	0	4	4	0	0	0	2	10
22	0	2	2	33	17	14	3	0	4	0	0	4	0	12	8	2	1	1	6	27
22	1	2	1	14	6	3	3	0	5	0	1	3	1	3	2	1	0	0	8	6
22	1	2	2	42	12	9	3	0	5	2	0	3	0	25	13	6	6	0	13	29
22	0	3	1	16	8	8	0	0	1	0	0	0	1	7	4	2	1	0	3	13
22	0	3	2	56	17	13	4	0	4	0	0	4	0	35	22	12	1	0	18	38
22	1	3	1	32	25	22	3	0	5	0	0	3	2	2	0	1	1	0	9	23
22	1	3	2	49	17	13	4	0	0	0	0	0	0	32	27	5	0	0	9	40
23*	0	1	1	31	14	10	0	4	0	0	0	0	0	17	13	4	0	0	4	27
23*	0	1	2	44	11	8	3	0	0	0	0	0	0	33	0	0	0	0	2	42
23*	1	1	1	43	9	6	3	0	10	1	4	5	0	24	20	0	4	0	9	34
23*	1	1	2	50	6	5	1	0	10	2	4	4	0	34	31	2	0	0	9	41
23*	0	2	1	32	10	7	0	3	8	1	5	1	1	14	9	3	2	0	6	26
23*	0	2	2	55	16	15	1	0	12	7	0	5	0	27	18	9	0	0	21	34
23*	1	2	1	15	4	3	1	0	9	0	7	1	1	2	2	0	0	0	3	12
23*	1	2	2	57	8	8	0	0	25	6	12	7	0	24	11	10	3	0	23	34
23	0	3	1	27	14	11	0	3	4	0	0	0	4	9	7	2	0	0	6	21

Taureau X	Dilution	Coloration	Opérateur	Anomalies	Tête	Tête Seule	Tête Déformée	Tête Repliée	Pièce Intermédiaire	PI Gouttelette Proximale	PI Gouttelette Distale	PI Déformée	PI Repliée	Queue	Queue repliée	Queue enroulée prox	Queue enroulée dist	Queue courte	Majeures	mineures
23	0	3	2	50	20	13	7	0	1	0	0	0	1	29	20	5	4	0	8	42
23	1	3	2	46	14	11	3	0	3	2	0	1	0	29	27	1	1	0	7	39
24*	0	1	1	104	36	26	6	4	4	3	0	1	0	64	46	14	4	0	24	80
24*	0	1	2	114	43	27	16	0	4	0	0	4	0	67	58	6	4	0	37	77
24*	1	1	1	36	20	15	5	0	0	0	0	0	0	16	9	7	0	0	12	24
24*	1	1	2	57	33	26	7	0	3	1	0	1	1	21	14	7	0	0	17	40
24*	0	2	1	55	29	16	11	2	9	4	1	3	1	17	8	8	0	1	27	28
24*	0	2	2	88	56	36	20	0	5	1	0	4	0	27	19	8	0	0	27	61
24*	1	2	1	43	17	7	7	3	9	5	2	0	2	17	9	7	1	0	21	22
24*	1	2	2	67	41	36	5	0	10	7	0	3	0	16	7	5	2	2	20	47
24	0	3	1	91	63	41	19	3	7	0	0	2	5	21	13	6	2	0	32	59
24	0	3	2	114	96	86	9	1	4	0	0	4	0	14	7	2	5	0	13	101
24	1	3	1	33	31	19	11	1	0	0	0	0	0	2	2	0	0	0	11	22
24	1	3	2	59	37	32	5	0	3	0	0	3	0	19	14	5	0	0	13	46
25*	0	1	1	54	5	5	0	0	2	1	0	1	0	47	36	11	0	0	13	41
25*	0	1	2	69	6	3	3	0	1	1	0	0	0	62	43	15	4	0	17	52
25*	1	1	1	17	8	4	2	2	2	0	0	2	0	7	4	3	0	0	7	10
25*	1	1	2	25	9	7	2	0	2	1	0	1	0	14	8	5	1	0	9	16
25*	0	2	1	16	7	7	0	0	3	0	2	1	0	6	5	1	0	0	2	14
25*	0	2	2	65	14	10	4	0	2	0	2	0	0	49	31	12	6	0	14	51
25*	1	2	1	25	13	2	7	4	5	0	2	3	0	7	4	1	2	0	11	14
25*	1	2	2	28	14	12	2	0	3	0	3	0	0	11	10	1	0	0	3	25
25	0	3	1	20	10	4	6	0	2	0	0	2	0	8	6	2	0	0	10	10
25	0	3	2	59	16	13	3	0	4	0	0	2	2	39	25	10	4	0	14	45
25	1	3	1	20	9	5	3	1	5	0	0	5	0	6	4	2	0	0	10	10
25	1	3	2	61	11	8	2	1	9	1	0	8	0	41	33	6	0	2	16	45
26*	0	1	1	45	4	1	1	2	3	1	0	2	0	38	28	10	0	0	14	31
26*	0	1	2	74	7	4	3	0	4	0	0	4	0	63	43	5	15	0	11	63
26*	1	1	1	35	1	1	0	0	7	1	1	5	0	27	19	8	0	0	14	21
26*	1	1	2	44	8	3	5	0	4	1	0	3	0	32	24	6	2	0	15	29
26*	0	2	1	38	7	6	0	1	12	2	9	1	0	19	12	7	0	0	10	28
26*	0	2	2	81	18	6	12	0	13	0	2	11	0	50	30	12	7	1	29	52
26*	1	2	1	37	4	4	0	0	20	1	15	4	0	13	8	4	1	0	9	28
26*	1	2	2	54	12	8	4	0	16	4	9	3	0	26	19	6	0	1	17	37
26	0	3	2	78	17	10	7	0	5	0	0	5	0	56	37	9	10	0	18	60
26	1	3	1	13	2	1	1	0	1	0	0	0	1	10	7	3	0	0	5	8
26	1	3	2	41	15	13	2	0	2	2	0	0	0	24	17	5	2	0	9	32
27*	0	1	1	37	7	1	6	0	2	1	1	0	0	28	27	1	0	0	8	29
27*	0	1	2	75	14	6	8	0	2	0	0	2	0	59	44	10	5	0	18	57
27*	1	1	1	17	2	2	0	0	1	0	0	1	0	14	5	2	4	3	3	14
27*	1	1	2	30	6	5	1	0	0	0	0	0	0	24	18	6	0	0	7	23
27*	0	2	1	10	0	0	0	0	6	1	1	2	2	4	2	2	0	0	7	3
27*	0	2	2	47	16	2	12	2	0	0	0	0	0	31	25	5	1	0	9	38
27*	1	2	1	19	9	2	7	0	4	0	4	0	0	6	5	0	1	0	7	12
27*	1	2	2	37	11	6	4	1	12	4	7	1	0	14	10	1	0	3	8	29
27	0	3	1	26	14	6	6	2	4	2	2	0	0	8	0	6	2	0	14	12
27	0	3	2	55	12	5	7	0	1	0	0	1	0	42	33	4	5	0	8	47
27	1	3	1	13	7	1	4	2	2	0	0	2	0	4	2	2	0	0	7	6
27	1	3	2	31	3	3	0	0	8	8	0	0	0	20	12	4	4	0	12	19
28	0	1	2	71	12	5	7	0	3	0	0	3	0	56	36	10	10	0	19	52
28	1	1	1	16	6	2	4	0	0	0	0	0	0	10	10	0	0	0	4	12
28	1	1	2	41	20	5	15	0	3	2	0	1	0	18	16	2	0	0	15	26
28	0	2	2	47	24	10	14	0	0	0	0	0	0	23	13	8	2	0	21	26

Taureau X	Dilution	Coloration	Opérateur	Anomalies	Tête	Tête Seule	Tête Déformée	Tête Repliée	Pièce Intermédiaire	PI Gouttelette Proximale	PI Gouttelette Distale	PI Déformée	PI Repliée	Queue	Queue repliée	Queue enroulée prox	Queue enroulée dist	Queue courte	Majeures	mineures
28	1	2	1	40	20	0	20	0	6	2	0	4	0	14	6	8	0	0	34	6
28	1	2	2	53	29	11	16	2	7	4	0	3	0	17	13	4	0	0	22	31
28	0	3	2	60	30	8	21	1	2	0	0	2	0	28	12	13	2	1	32	28
28	1	3	1	26	10	2	8	0	4	0	0	4	0	12	8	4	0	0	16	10
28	1	3	2	40	14	5	9	0	1	0	0	1	0	25	8	15	2	0	22	18
29*	0	1	1	13	4	3	1	0	0	0	0	0	0	9	6	3	0	0	4	9
29*	0	1	2	32	7	2	5	0	3	0	0	2	1	22	18	4	0	0	7	35
29*	1	1	1	5	3	3	0	0	0	0	0	0	0	2	2	0	0	0	0	5
29*	1	1	2	17	6	3	2	1	4	1	0	3	0	7	7	0	0	0	6	11
29*	0	2	1	8	4	0	3	1	2	0	0	1	1	2	1	1	0	0	6	2
29*	0	2	2	41	3	2	0	1	3	1	0	2	0	35	29	6	0	0	9	32
29*	1	2	1	4	1	0	1	0	2	1	0	1	0	1	1	0	0	0	3	1
29*	1	2	2	20	1	0	1	0	3	0	0	3	0	16	11	5	0	0	9	11
29	0	3	1	8	1	1	0	0	2	0	0	2	0	5	3	2	0	0	4	4
29	0	3	2	35	8	5	3	0	0	0	0	0	0	27	20	6	1	0	7	28
29	1	3	1	13	4	3	1	0	1	0	0	0	1	8	8	0	0	0	2	11
29	1	3	2	48	5	5	0	0	2	0	0	1	1	41	34	5	2	0	7	41
30	0	1	1	47	35	21	14	0	2	0	0	1	1	10	6	3	1	0	19	28
30	0	1	1	32	15	7	8	0	0	0	0	0	0	17	6	5	6	0	13	19
30	0	1	2	44	28	20	8	0	1	0	0	1	0	15	9	2	4	0	7	37
30	0	1	2	41	23	8	15	0	5	0	0	5	0	13	7	6	0	0	26	15
30	0	2	1	49	30	21	8	1	8	4	1	2	1	11	8	3	0	0	18	31
30	0	2	1	28	15	6	8	1	5	2	1	1	1	8	8	0	0	0	12	16
30	0	2	2	61	34	19	13	2	3	0	0	3	0	24	18	4	2	0	11	50
30	0	2	2	55	20	17	3	0	6	3	0	3	0	29	20	6	2	1	15	40
30	0	3	1	39	28	18	8	2	1	0	0	1	0	10	7	1	1	1	10	29
30	0	3	1	30	16	7	6	3	2	1	0	1	0	12	11	1	0	0	9	21
30	0	3	2	49	33	24	8	1	2	0	0	2	0	14	10	4	0	0	14	35
30	0	3	2	46	17	13	4	0	6	3	0	3	0	23	12	11	0	0	21	25
31*	0	1	1	77	24	18	4	2	30	20	7	1	2	23	18	3	0	2	30	47
31*	0	1	2	71	23	16	7	0	1	0	0	1	0	47	33	10	4	0	13	58
31*	1	1	1	19	6	4	1	1	6	3	0	3	0	7	2	5	0	0	12	6
31*	1	1	2	45	19	15	4	0	11	10	0	1	0	15	8	5	2	0	20	25
31*	0	2	1	133	11	7	4	0	112	106	2	3	1	10	4	6	0	0	120	13
31*	0	2	2	121	23	16	7	0	78	60	5	13	0	20	4	12	4	0	87	34
31*	1	2	1	82	10	7	1	2	64	57	2	5	0	8	2	6	0	0	69	13
31*	1	2	2	61	9	6	3	0	41	38	3	0	0	11	4	6	0	1	46	15
31	0	3	1	56	12	8	0	4	40	34	6	0	0	4	0	4	0	0	38	18
31	0	3	2	52	28	19	9	0	1	0	0	1	0	23	9	10	4	0	14	38
31	1	3	1	36	14	12	2	0	14	8	0	6	0	8	8	0	0	0	16	20
31	1	3	2	48	4	3	1	0	0	0	0	0	0	44	35	9	0	0	10	38
32*	0	1	1	44	4	3	0	1	1	0	0	1	0	39	33	4	1	1	5	39
32*	0	1	2	50	12	5	7	0	0	0	0	0	0	38	24	2	12	0	7	43
32*	1	1	1	18	6	6	0	0	2	0	0	0	2	10	8	0	2	0	2	16
32*	1	1	2	49	9	9	0	0	4	1	0	3	0	36	21	1	14	0	5	44
32*	0	2	1	15	1	1	0	0	0	0	0	0	0	14	11	3	0	0	3	12
32*	0	2	2	52	13	12	1	0	4	0	0	4	0	35	25	7	3	0	12	40
32*	1	2	1	22	2	2	0	0	2	0	0	0	2	18	14	2	0	2	4	18
32*	1	2	2	33	6	5	1	0	2	0	0	2	0	25	16	7	2	0	10	23
32	0	3	1	12	4	3	1	0	3	0	0	3	0	5	4	1	0	0	5	7
32	0	3	2	48	8	6	2	0	1	0	0	1	0	39	25	11	3	0	12	36
32	1	3	1	18	6	6	0	0	0	0	0	0	0	12	12	0	0	0	0	18

Taureau X	Dilution	Coloration	Opérateur	Anomalies	Tête	Tête Seule	Tête Déformée	Tête Repliée	Pièce Intermédiaire	PI Gouttelette Proximale	PI Gouttelette Distale	PI Déformée	PI Repliée	Queue	Queue repliée	Queue enroulée prox	Queue enroulée dist	Queue courte	Majeures	mineures
32	1	3	2	28	5	4	1	0	2	1	0	1	0	21	19	1	1	0	4	24
33*	0	1	1	69	10	6	4	0	6	5	0	1	0	53	38	8	7	0	18	51
33*	0	1	2	56	10	8	2	0	0	0	0	0	0	46	25	3	18	0	4	52
33*	1	1	1	17	8	5	2	1	1	0	0	0	1	8	6	2	0	0	5	12
33*	1	1	2	32	17	15	2	0	3	2	0	1	0	12	8	0	4	0	5	27
33*	0	2	1	40	16	10	4	2	16	9	4	3	0	8	5	3	0	0	19	21
33*	0	2	2	52	27	23	4	0	4	1	0	3	0	21	14	7	0	0	13	39
33*	1	2	1	41	12	8	3	1	17	8	6	3	0	12	6	6	0	0	20	21
33*	1	2	2	52	14	10	2	2	29	16	7	6	0	9	9	0	0	0	24	28
33	0	3	1	41	16	13	3	0	11	3	2	6	0	14	6	6	2	0	18	23
33	0	3	2	64	33	21	10	2	6	2	3	1	0	25	14	9	1	1	19	45
33	1	3	1	21	13	10	3	0	3	1	0	1	1	5	3	2	0	0	8	13
33	1	3	2	30	10	6	4	0	0	0	0	0	0	20	16	4	0	0	8	22
34*	0	1	1	42	14	5	9	0	0	0	0	0	0	28	25	2	1	0	11	31
34*	0	1	2	56	4	1	1	2	4	0	0	4	0	48	30	10	8	0	15	41
34*	1	1	1	9	2	1	1	0	1	0	0	1	0	6	4	2	0	0	4	5
34*	1	1	2	22	5	2	1	2	1	0	0	0	1	16	12	0	4	0	2	20
34*	0	2	1	11	4	1	3	0	2	0	1	1	0	5	3	1	0	1	5	6
34*	0	2	2	74	7	3	4	0	3	0	0	3	0	64	45	10	9	0	14	60
34*	1	2	1	7	2	0	2	0	2	0	0	2	0	3	2	1	0	0	5	2
34*	1	2	2	36	6	4	1	1	6	4	0	2	0	24	16	6	2	0	13	23
34	0	3	1	11	6	0	6	0	3	0	0	3	0	2	0	2	0	0	11	0
34	0	3	2	42	8	4	3	1	3	1	0	1	1	31	31	0	0	0	5	37
34	1	3	1	13	3	2	1	0	3	0	0	3	0	7	5	2	0	0	6	7
34	1	3	2	42	3	0	3	0	2	0	0	1	1	37	33	4	0	0	9	33
35	0	1	1	56	12	6	6	0	8	0	0	6	2	36	22	14	0	0	28	28
35	0	1	2	46	27	19	8	0	2	1	0	1	0	17	9	8	0	0	18	28
35	0	2	1	50	15	6	9	0	10	0	4	6	0	25	13	11	1	0	26	24
35	0	2	2	82	27	19	8	0	6	0	1	5	0	49	35	10	3	1	18	64
35	0	3	1	39	10	5	5	0	2	0	0	2	0	27	23	4	0	0	11	28
35	0	3	2	71	20	14	5	1	0	0	0	0	0	51	38	8	5	0	13	58
36	0	1	1	118	106	8	80	18	4	0	0	2	0	8	8	0	0	0	84	34
36	0	1	2	156	144	24	120	0	8	4	0	4	0	4	0	0	4	0	124	32
36	0	2	1	148	76	8	60	8	68	52	10	6	0	4	0	4	0	0	122	26
36	0	2	2	158	146	24	120	2	6	0	0	6	0	6	6	0	0	0	126	32
36	0	3	1	136	120	6	104	10	4	0	0	4	0	12	8	4	0	0	112	24
36	0	3	2	157	149	0	112	37	1	0	0	1	0	7	4	3	0	0	116	41

**Annexe III : Comparaison du pourcentage d'anomalies morphologiques selon le statut de l'opérateur et les colorations vitales (n = 23)**

Tableau 19 : Pourcentage d'anomalies morphologiques (moyenne ± écart-type) selon le statut de l'opérateur (expérimenté/novice) et la coloration vitale (Vita-Eosine®/Sperm VitalStain®) (n = 23)

<b>% d'anomalies (m ± sd)</b>	<b>Vita-Eosine®</b>	<b>Sperm VitalStain®</b>
<b>Total</b>		
Expérimenté	21,1 <sup>A</sup> ± 15,0	16,1 <sup>A</sup> ± 11,8
Novice	28,0 <sup>B</sup> ± 13,9	28,4 <sup>B</sup> ± 10,4
<b>Tête</b>		
Expérimenté	4,8 <sup>A</sup> ± 4,0	4,6 <sup>A</sup> ± 3,8
Novice	6,9 <sup>B</sup> ± 5,3	8,0 <sup>B</sup> ± 6,3
<b>Pièce intermédiaire</b>		
Expérimenté	1,4 <sup>A</sup> ± 2,3	5,5 <sup>A</sup> ± 9,2
Novice	1,5 <sup>A</sup> ± 1,2	4,9 <sup>A</sup> ± 6,7
<b>Queue</b>		
Expérimenté	14,9 <sup>A</sup> ± 12,9	5,1 <sup>A</sup> ± 6,0
Novice	19,6 <sup>B</sup> ± 12,7	16,3 <sup>B</sup> ± 8,0

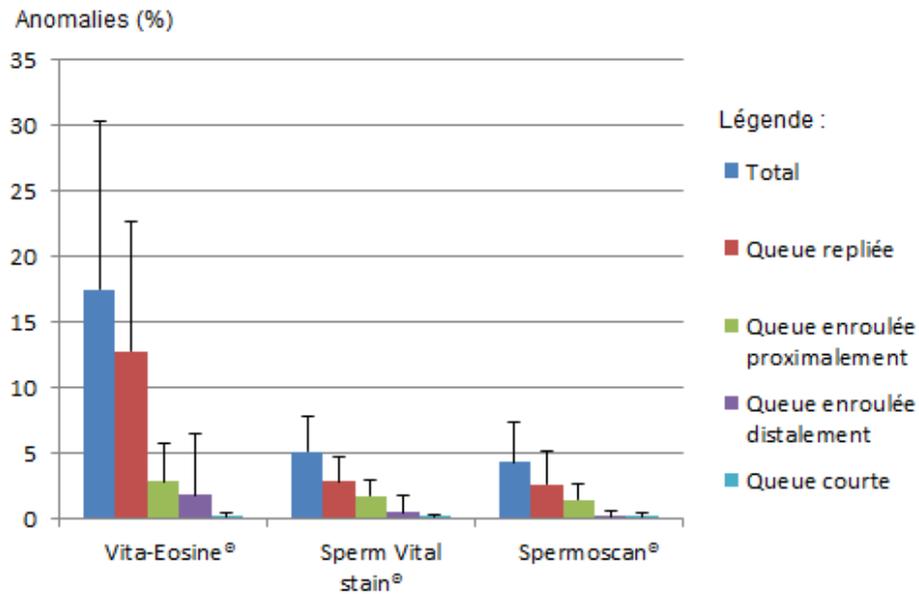
<sup>A, B</sup> : les valeurs avec des exposants différents dans la même colonne sont significativement différentes (p < 0,05 ; ANOVA)

Tableau 20 : Influence de l'état de dilution (dilué/non dilué) et de la coloration vitale sur le pourcentage d'anomalies morphologiques (moyenne ± écart-type) (n = 23)

<b>Anomalies (%)</b>	<b>Vita-Eosine®</b>	<b>Sperm VitalStain®</b>
<b>Total</b>		
Sperme dilué	17,3 <sup>A</sup> ± 9,1	19,8 <sup>A</sup> ± 10,5
Sperme non dilué	31,7 <sup>B</sup> ± 16,8	24,6 <sup>B</sup> ± 14,6
<b>Tête</b>		
Sperme dilué	5,0 <sup>A</sup> ± 3,6	5,4 <sup>A</sup> ± 4,1
Sperme non dilué	6,7 <sup>B</sup> ± 5,6	7,4 <sup>B</sup> ± 6,4
<b>Pièce intermédiaire (PI)</b>		
Sperme dilué	1,4 <sup>A</sup> ± 2,3	5,5 <sup>A</sup> ± 9,2
Sperme non dilué	1,5 <sup>A</sup> ± 2,3	5,1 <sup>A</sup> ± 9,6
<b>Queue</b>		
Sperme dilué	14,9 <sup>A</sup> ± 7,4	5,8 <sup>A</sup> ± 6,0
Sperme non dilué	23,5 <sup>B</sup> ± 13,2	12,9 <sup>B</sup> ± 10,1

<sup>A, B</sup> : les valeurs avec des exposants différents dans la même colonne sont significativement différentes (p < 0,05 ; ANOVA)

## Annexe IV : Effet de la coloration sur le type d'anomalies de queue recensées



Graphique 5 : Pourcentage d'anomalies de queue selon le type d'anomalies (queue : repliée/enroulée proximatement/enroulée distalement/courte) et selon la coloration (Vita-Eosine®/Sperm VitalStain®/Spermoscane®)

## **Annexe V : Effet de la dilution sur le type d'anomalies de queue recensées**

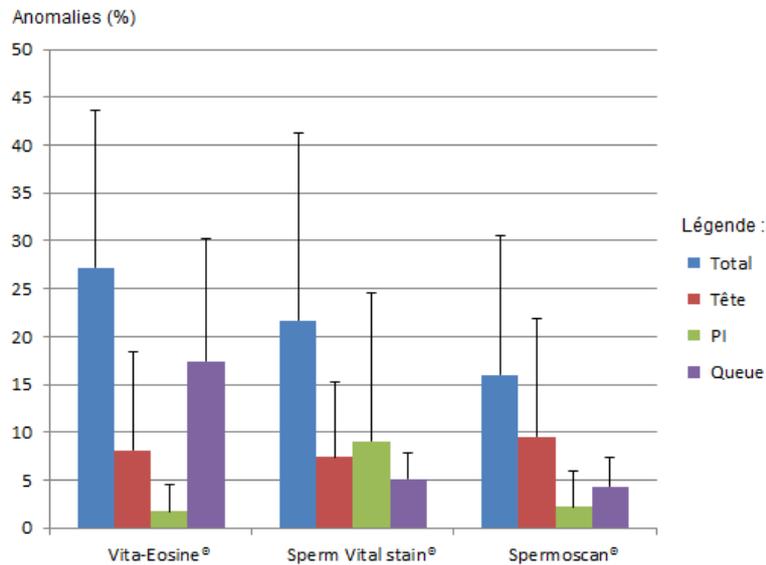
Tableau 21 : Comparaison du pourcentage d'anomalies de queue (moyenne  $\pm$  écart-type) selon l'état de la dilution (dilué/non dilué)

<b>% d'anomalies (m <math>\pm</math> sd)</b>	<b>Vita-Eosine®</b>	<b>Sperm VitalStain®</b>	<b>Spermoscan®</b>
<b>Queue (total)</b>			
Sperme non dilué	24,4 <sup>A</sup> $\pm$ 13,6	12,3 <sup>A</sup> $\pm$ 9,4	10,5 <sup>A</sup> $\pm$ 9,0
Sperme dilué	9,5 <sup>B</sup> $\pm$ 7,4	8,2 <sup>B</sup> $\pm$ 6,1	10,9 <sup>A</sup> $\pm$ 9,9
<b>Queue repliée</b>			
Sperme non dilué	17,6 <sup>A</sup> $\pm$ 10,0	7,7 <sup>A</sup> $\pm$ 6,7	5,9 <sup>A</sup> $\pm$ 5,3
Sperme dilué	6,2 <sup>B</sup> $\pm$ 4,8	5,1 <sup>B</sup> $\pm$ 3,9	8,5 <sup>A</sup> $\pm$ 7,2
<b>Queue enroulée proximatement</b>			
Sperme non dilué	3,6 <sup>A</sup> $\pm$ 2,8	3,1 <sup>A</sup> $\pm$ 2,5	3,2 <sup>A</sup> $\pm$ 3,5
Sperme dilué	1,5 <sup>B</sup> $\pm$ 1,6	1,8 <sup>B</sup> $\pm$ 1,8	1,9 <sup>B</sup> $\pm$ 3,2
<b>Queue enroulée distalement</b>			
Sperme non dilué	3,1 <sup>A</sup> $\pm$ 4,7	1,5 <sup>A</sup> $\pm$ 2,2	1,3 <sup>A</sup> $\pm$ 2,4
Sperme dilué	1,7 <sup>B</sup> $\pm$ 3,2	1,1 <sup>A</sup> $\pm$ 2,2	0,3 <sup>B</sup> $\pm$ 0,9
<b>Queue courte</b>			
Sperme non dilué	0,1 <sup>A</sup> $\pm$ 0,3	0,0 <sup>A</sup> $\pm$ 0,1	0,1 <sup>A</sup> $\pm$ 0,4
Sperme dilué	0,1 <sup>A</sup> $\pm$ 0,3	0,2 <sup>B</sup> $\pm$ 0,4	0,2 <sup>A</sup> $\pm$ 0,7

<sup>A, B</sup>: les valeurs avec des exposants différents dans la même colonne sont significativement différentes ( $p < 0,05$  ; ANOVA)

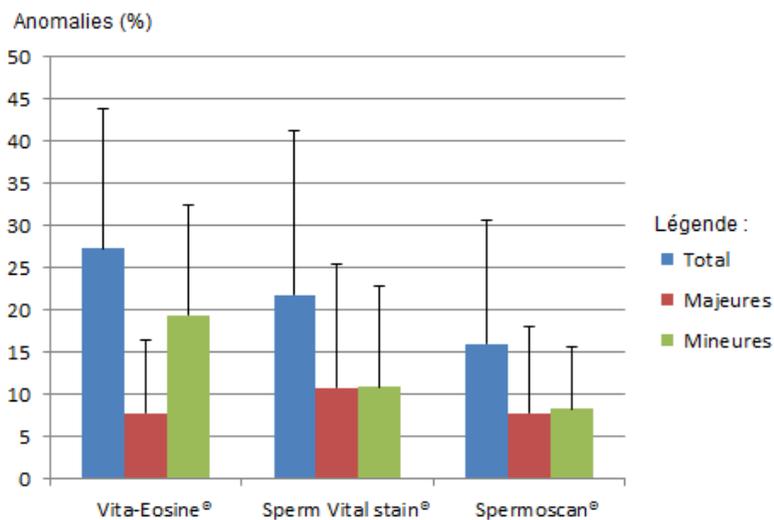
## Annexe VI : Etude de l'influence de la coloration sur le pourcentage d'anomalies morphologiques (opérateur expérimenté, semences non diluées)

### 1. Etude de l'ensemble des anomalies



Graphique 6 : Pourcentage d'anomalies selon leur localisation (Tête/Pièce intermédiaire (PI)/Queue) et selon la coloration (Vita-Eosine®/Sperm VitalStain®/Spermocan®)

### 2. Etude selon la classification de Blom



Graphique 7 : Pourcentage d'anomalies selon la classification de Blom (anomalies majeures/mineures) et selon la coloration (Vita-Eosine®/Sperm VitalStain®/Spermocan®)

**NOM** : DECAUDIN    **PRENOM** : ADELINE

**TITRE** : COMPARAISON DE DIFFERENTES METHODES DE COLORATION DE LA SEMENCE BOVINE POUR L'EVALUATION DE LA VITALITE ET DES ANOMALIES MORPHOLOGIQUES DES SPERMATOZOÏDES : colorations « Vita-Eosine », « Sperm VitalStain » et « Spermoscan ».

**RESUME** : L'appréciation de la vitalité et des anomalies morphologiques des spermatozoïdes sont des éléments du spermogramme, accessibles au praticien, permettant une première estimation de la fertilité du taureau. Le but de cette thèse est de comparer, parmi les différentes techniques disponibles, deux colorations vitales à base d'éosine-nigrosine (Vita-Eosine® et Sperm VitalStain®) et une coloration totale (Spermoscan®) pour l'évaluation de la vitalité et des anomalies morphologiques des spermatozoïdes dans la semence fraîche de taureau. L'effet du dilueur Bioxcell® sur ces deux paramètres est aussi étudié.

Les résultats montrent une vitalité apparente plus faible avec la coloration Vita-Eosine® qu'avec la coloration Sperm VitalStain®. La vitalité apparente varie également en fonction de l'utilisation du dilueur Bioxcell®, l'association des colorants avec le dilueur entraînant une surestimation de la mortalité. Pour les anomalies morphologiques, la coloration Vita-Eosine® est associée à un plus grand nombre d'anomalies dues à l'apparition d'anomalies artéfactuelles telle que la queue repliée. La coloration Spermoscan® est associée au nombre d'anomalies le plus faible : bien que plus facile à réaliser, sa lecture est plus laborieuse. La coloration Sperm VitalStain® est le meilleur compromis des colorations comparées (étape unique de coloration, artéfacts moins présents qu'avec Vita-Eosine®). L'utilisation du Bioxcell® lors du spermocytogramme semble diminuer les artéfacts liés à l'utilisation de l'éosine-nigrosine.

**MOTS-CLES** : SPERMATOZOÏDES, ANOMALIES MORPHOLOGIQUES, VITALITE, COLORATION, DILUEUR, TAUREAU, VITA-EOSINE®, SPERM VITALSTAIN®, SPERMOSCAN®, BIOXCELL®

---

**TITLE** : COMPARISON OF DIFFERENT STAINING METHODS OF BULL SEMEN FOR THE EVALUATION OF VITALITY AND MORPHOLOGY OF SPERMATOZOA : staining "Vita-Eosin", "Sperm VitalStain" and "Spermoscan".

**ABSTRACT** : The spermatozoa vitality and morphological abnormalities are elements of the spermogram, available to practitioners, allowing a first estimation of bull's fertility. The goal of this thesis is to compare, among the various techniques, two vital stains, eosine-nigrosine based (Vita-Eosine®, Sperm VitalStain®), and a total stain (Spermoscan®) for the evaluation of sperm vitality and morphological abnormalities within the fresh semen of bull. The effect of the extender Bioxcell® for these two parameters is also studied.

The results demonstrate an apparent weaker vitality with Vita-Eosine® than with Sperm VitalStain®. The apparent vitality also varies according to the use of the extender Bioxcell®, the coupling of the stains and the extender resulting in an overestimation of the mortality. Concerning the morphological abnormalities, the Vita-Eosine® stain is linked to a higher number of abnormalities, due to the occurrence of artefactual abnormalities such as folded tail. The Spermoscan® stain is linked to the lowest number of abnormalities: although easier to apply, the reading is more laborious. The Sperm VitalStain® stain is the best compromise for the compared stains (sole stain step, lower presence of artefact than Vita-Eosine®). The use of Bioxcell® during the spermocytogram seems to diminish the artefact linked to the use of eosine-nigrosine staining.

**KEY WORDS** : SPERMATOZOA, SPERM MORPHOLOGY, SPERM VITALITY, STAIN, EXTENDER, BULL, VITA-EOSINE®, SPERM VITALSTAIN®, SPERMOSCAN®, BIOXCELL®