

COMPARAISON DES METHODES D'EVALUATION DE LA QUALITE DE LA SEMENCE DANS LES ESPECES BOVINE, CANINE ET HUMAINE

THESE

pour obtenir le grade de
DOCTEUR VETERINAIRE

DIPLOME D'ETAT

*présentée et soutenue publiquement en 2008
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

Carole, Rosine CABANNES

Née le 17 Juillet 1983 à Albi (Tarn)

Directeur de thèse : Mme le Professeur Nicole HAGEN-PICARD

JURY

PRESIDENT :

M. Jean PARINAUD

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEUR :

Mme Nicole HAGEN-PICARD

M. Xavier BERTHELOT

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

MEMBRE(S) INVITES(S) :

Mme Patricia RONSIN

M. Brahim KHIREDDINE

Docteur en Médecine Vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

Docteur en Médecine Vétérinaire, COPELSO

Ministère de l'Agriculture et de la Pêche
ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE

Directeur : M. A. MILON

Directeurs honoraires M. G. VAN HAVERBEKE.
M. P. DESNOYERS

Professeurs honoraires :

M. L. FALIU	M. J. CHANTAL	M. BODIN ROZAT DE MENDRES NEGRE
M. C. LABIE	M. JF. GUELFU	
M. C. PAVAU	M. EECKHOUTTE	
M. F. LESCURE	M. D.GRIESS	
M. A. RICO	M. CABANIE	
M. A. CAZIEUX	M. DARRE	
Mme V. BURGAT	M. HENROTEAUX	

PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE

M. BRAUN Jean-Pierre, *Physique et Chimie biologiques et médicales*
M. DORCHIES Philippe, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
M. EUZEBY Jean, *Pathologie générale, Microbiologie, Immunologie*
M. TOUTAIN Pierre-Louis, *Physiologie et Thérapeutique*

PROFESSEURS 1°CLASSE

M. AUTEFAGE André, *Pathologie chirurgicale*
Mme CLAUW Martine, *Pharmacie-Toxicologie*
M. CORPET Denis, *Science de l'Aliment et Technologies dans les Industries agro-alimentaires*
M. DELVERDIER Maxence, *Anatomie Pathologique*
M. ENJALBERT Francis, *Alimentation*
M. FRANCO Michel, *Parasitologie et Maladies parasitaires*
M. MARTINEAU Guy, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*
M. PETIT Claude, *Pharmacie et Toxicologie*
M. REGNIER Alain, *Physiopathologie oculaire*
M. SAUTET Jean, *Anatomie*
M. SCHELCHER François, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*

PROFESSEURS 2°CLASSE

Mme BENARD Geneviève, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
M. BERTHELOT Xavier, *Pathologie de la Reproduction*
M. BOUSQUET-MELOU Alain, *Physiologie et Thérapeutique*
M. CONCORDET Didier, *Mathématiques, Statistique, Modélisation*
M. DUCOS Alain, *Zootecnie*
M. DUCOS DE LAHITTE Jacques, *Parasitologie et Maladies parasitaires*
Mme GAYRARD-TROY Véronique, *Physiologie de la Reproduction, Endocrinologie*
M. GUERRE Philippe, *Pharmacie et Toxicologie*
Mme HAGEN-PICARD Nicole, *Pathologie de la Reproduction*
M. LEFEBVRE Hervé, *Physiologie et Thérapeutique*
M. LIGNEREUX Yves, *Anatomie*
M. PICAVET Dominique, *Pathologie infectieuse*
M. SANS Pierre, *Productions animales*
Mme TRUMEL Catherine, *Pathologie médicale des Equidés et Carnivores*

INGENIEUR DE RECHERCHE

M. **TAMZALI Youssef**, *Responsable Clinique Equine*

PROFESSEURS CERTIFIES DE L'ENSEIGNEMENT AGRICOLE

Mme **MICHAUD Françoise**, *Professeur d'Anglais*

M **SEVERAC Benoît**, *Professeur d'Anglais*

MAITRES DE CONFERENCES HORS CLASSE

M. **JOUGLAR Jean-Yves**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*

MAITRES DE CONFERENCES (classe normale)

M. **ASIMUS Erik**, *Pathologie chirurgicale*

M. **BAILLY Jean-Denis**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*

Mme **BENNIS-BRET Lydie**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*

M. **BERGONIER Dominique**, *Pathologie de la Reproduction*

M. **BERTAGNOLI Stéphane**, *Pathologie infectieuse*

Mme **BOUCLAINVILLE-CAMUS Christelle**, *Biologie cellulaire et moléculaire*

Mlle **BOULLIER Séverine**, *Immunologie générale et médicale*

Mme **BOURGES-ABELLA Nathalie**, *Histologie, Anatomie pathologique*

M. **BRUGERE Hubert**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*

Mlle **CADIERGUES Marie-Christine**, *Dermatologie*

M. **CORBIERE Fabien**, *Pathologie des ruminants*

Mlle **DIQUELOU Armelle**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*

M. **DOSSIN Olivier**, (DISPONIBILITE) *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*

M. **FOUCRAS Gilles**, *Pathologie du Bétail*

M. **GUERIN Jean-Luc**, *Elevage et Santé avicoles et cunicoles*

M. **JACQUIET Philippe**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*

M. **JAEG Jean-Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*

Mlle **LACROUX Caroline**, *Anatomie Pathologique des animaux de rente*

M. **LYAZRHI Faouzi**, *Statistiques biologiques et Mathématiques*

M. **MATHON Didier**, *Pathologie chirurgicale*

M **MEYER Gilles**, *Pathologie des ruminants.*

Mme **MEYNAUD-COLLARD Patricia**, *Pathologie Chirurgicale*

M. **MOGICATO Giovanni**, *Anatomie, Imagerie médicale*

M. **MONNEREAU Laurent**, *Anatomie, Embryologie*

Mlle **PALIERNE Sophie**, *Chirurgie des animaux de compagnie*

Mme **PRIYMENKO Nathalie**, *Alimentation*

Mme **LETRON-RAYMOND Isabelle**, *Anatomie pathologique*

Mme **TROGELER-MEYNADIER Annabelle**, *Alimentation*

M. **VOLMER Romain**, *Microbiologie et Infectiologie*

M. **VERWAERDE Patrick**, *Anesthésie, Réanimation*

MAITRES DE CONFERENCES CONTRACTUEL

Mlle **BUCK-ROUCH**, *Médecine interne des animaux de compagnie*

M. **CASSARD Hervé**, *Pathologie du bétail*

M. **DOUET Jean-Yves**, *Ophthalmologie*

M. **SEGUELA Jérôme**, *Médecine interne des animaux de compagnie*

M **VERSET Michaël**, *Chirurgie des animaux de compagnie*

ASSISTANTS D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE CONTRACTUELS

Mlle **BIBBAL Delphine**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*

M. **CONCHOU Fabrice**, *Imagerie médicale*

M. **GIN Thomas**, *Production et pathologie porcine*

M. **LIENARD Emmanuel**, *Parasitologie et maladies parasitaires*

M. **NOUVEL Laurent**, *Pathologie de la reproduction*

M. **RABOISSON Didier**, *Productions animales*

Mlle **TREVENNEC Karen**, *Epidémiologie, gestion de la santé des élevages avicoles et porcins*

Remerciements

A Monsieur le Professeur Jean PARINAUD,

Professeur à l'Université Paul Sabatier de Toulouse,
Biologie du développement et de la reproduction,

Qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de notre jury de thèse,
Hommages respectueux.

A Madame le Professeur Nicole HAGEN-PICARD,

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

Qui a initié ce travail et nous a guidé dans sa réalisation,
Pour sa disponibilité et son aide précieuse,
Profonde gratitude.

A Monsieur le Professeur Xavier BERTHELOT,

De l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse,
Pathologie de la reproduction,

Qui nous a fait l'honneur de participer à notre jury de thèse,
Sincères remerciements.

A Madame le Docteur Patricia RONSIN,

De l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse,
Pathologie de la reproduction,

Qui nous a fait l'honneur de participer à notre jury de thèse,
Pour son apport critique sur ce travail,
Sincères remerciements.

A Monsieur le Docteur Louis BUJAN,

Biologiste des hôpitaux au CHU de Toulouse-Purpan,
Andrologie – Médecine de la reproduction,

Pour son aide et son accueil au sein du laboratoire du CECOS de Toulouse,
Sincères remerciements.

A Monsieur le Docteur Brahim KHIREDDINE,

De la Coopelso à Soual,

Qui nous a fait l'honneur de participer à notre jury de thèse,
Pour ses conseils éclairés et son accueil,
Sincères remerciements.

A mes parents,

Pour leur soutien inconditionnel et leur bienveillance,
Toute ma reconnaissance et tout mon amour.

A ma sœur et mon frère,

A notre enfance partagée,
Je vous souhaite à tous les deux un brillant parcours dans la vie.

A toute ma famille.

A mes amies d'enfance,

A la meilleure équipe de hand-ball de tous les temps, aux saxophonistes les plus talentueuses de l'histoire du jazz, aux coupes de cheveux les plus...originales et surtout aux déguisements les plus inventifs,
A notre amitié sincère qui a su résister au temps et à la distance.

A Vanessa,

Des banquettes du Sherpa, aux grands galops en Cappadoce...en passant par le bar de l'ENAC,
A pour tous ces moments de bonne humeur passés et à tous ceux qui restent à venir.

A Raphaël,

Pour ses compétences en informatique et son soutien lors de la rédaction de cette thèse,
Merci.

A tous mes amis.

A tous ceux qui m'ont transmis leur savoir et leur passion.

TABLE DES MATIERES

1	CONTEXTE DE L'ETUDE	17
1.1	L'INSEMINATION ARTIFICIELLE EN FRANCE : HISTORIQUE ET ETAT DES LIEUX	17
1.1.1	<i>L'insémination artificielle dans l'espèce canine</i>	17
1.1.2	<i>L'insémination artificielle dans l'espèce bovine</i>	20
1.1.3	<i>L'insémination artificielle chez l'homme</i>	23
2	PHYSIOLOGIE DE LA REPRODUCTION ET PARAMETRES SEMINOLOGIQUES.....	27
2.1	PUBERTE ET SPERMATOGENESE	27
2.1.1	<i>Puberté</i>	27
2.1.2	<i>Spermatogénèse</i>	28
2.2	CARACTERISTIQUES DE L'EJACULATION ET DE L'EJACULAT	29
2.2.1	<i>Bovin</i>	29
2.2.2	<i>Chien</i>	29
2.2.3	<i>Homme</i>	31
2.3	CARACTERISTIQUES MORPHOLOGIQUES DU SPERMATOZOÏDE.....	32
2.3.1	<i>Bovin</i>	32
2.3.2	<i>Chien</i>	33
2.3.3	<i>Homme</i>	33
3	PARTIE DESCRIPTIVE : ETAT DES LIEUX DES METHODES D'EVALUATION DE LA QUALITE DU SPERME DANS LES DIFFERENTES ESPECES	35
3.1	EVALUATION DE LA QUALITE DE LA SEMENCE DANS L'ESPECE CANINE	35
3.1.1	<i>Contexte et lieu d'étude</i>	35
3.1.2	<i>Examen du sperme</i>	37
3.1.2.1	<i>Analyse macroscopique</i>	37
3.1.2.2	<i>Analyse microscopique</i>	38
3.1.3	<i>Examen après congélation</i>	46
3.1.4	<i>Interprétation des examens (Tableau 15)</i>	46
3.2	EVALUATION DE LA QUALITE DE LA SEMENCE DANS L'ESPECE BOVINE	47
3.2.1	<i>Contexte et lieu d'étude</i>	47

3.2.2	<i>Examen de la semence</i>	48
3.2.2.1	Organisation des locaux et matériel nécessaire	49
3.2.2.2	Analyse macroscopique.....	51
3.2.2.3	Examens microscopiques	52
3.2.3	<i>Interprétation des examens réalisés (Tableau 19)</i>	59
3.3	EVALUATION DE LA QUALITE DE LA SEMENCE CHEZ L'HOMME.....	60
3.3.1	<i>Contexte et lieu d'étude</i>	60
3.3.2	<i>Méthodes d'évaluation de la qualité de la semence</i>	61
3.3.2.1	Examen macroscopique.....	62
3.3.2.2	Examen microscopique	63
3.3.2.3	Tests d'interaction sperme-glaire	69
3.3.2.4	Examens complémentaires	71
3.4	RESUME DE L'EVALUATION DES PARAMETRES SEMINOLOGIQUES DANS LES ESPECES BOVINE, CANINE ET HUMAINE	75
4	LIMITES DES TECHNIQUES CLASSIQUES D'EXAMEN DU SPERME ET PERSPECTIVES POUR LE FUTUR	77
4.1	PRINCIPALES LIMITES DE L'EXAMEN CLASSIQUE DU SPERME.....	77
4.1.1	<i>Subjectivité et répétabilité des méthodes classiques d'examen de la semence</i>	77
4.1.2	<i>Standardisation et formation</i>	78
4.1.3	<i>Durée de l'analyse et nombre de cellules analysées</i>	79
4.1.4	<i>Relation entre les paramètres observés classiquement et la fertilité</i>	80
4.2	LES PERSPECTIVES ENVISAGEABLES EN COMPLEMENT DES METHODES CLASSIQUES.....	81
4.2.1	<i>Analyse du sperme assistée par ordinateur (Computer Assisted Sperm Analysis = CASA)</i>	81
4.2.2	<i>Tests de coloration fluorescente</i>	83
4.2.2.1	Principe de la cytométrie de flux : application aux marquages fluorescents	83
4.2.2.2	Intégrité de la membrane plasmique.....	84
4.2.2.3	Réaction acrosomique	85
4.2.2.4	Capacitation.....	87
4.2.2.5	Etat de condensation de la chromatine	88
4.2.3	<i>Test hypoosmotique</i>	90
4.2.4	<i>Test d'interaction spermatozoïde-ovocyte</i>	92
4.2.4.1	Test de liaison à la zone pellucide	92
4.2.4.2	Test de pénétration de l'ovocyte et test de fécondation in vitro.....	93
4.2.5	<i>Conclusion</i>	95

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Liste des figures.

Figure 1 : Inséminations artificielles bovines par département en 2006 (d'après les données de l'UNCEIA).....	22
Figure 2 : Liste des centres habilités pour le don de sperme en France.....	24
Figure 3 : Nombre d'inséminations artificielles en semence congelée pratiquées au CERCA de 2001 à 2006 (Benechet, 2007).....	36
Figure 4 : Comptage des spermatozoïdes à la cellule de Thoma; prise en compte des éléments « à cheval » sur les graduations.....	41
Figure 5 : Exemples d'anomalies morphologiques sur des spermatozoïdes colorés au Spermac® : spermatozoïde bicéphale, microcéphale et spermatozoïde ayant effectué la réaction acrosomique (CERCA, 2007).....	44
Figure 6 : Fiche utilisée au CERCA lors de l'examen de la semence.....	45
Figure 7 : Plan des locaux du laboratoire Coopelso.....	50
Figure 8 : Anomalies majeures et mineures de spermatozoïdes dans l'espèce bovine (Dumont, 1997).....	57
Figure 9 : Paramètres contrôlés par le Laboratoire National de Contrôle des Reproducteurs (Maisons-Alfort).....	58
Figure 10 : Représentations schématiques des anomalies de la tête selon la classification de David modifiée (Auger et Eustache, 2000).....	68
Figure 11 : Représentation schématique des anomalies de la pièce intermédiaire selon la classification de David modifiée (Auger et Eustache, 2000).....	68
Figure 12 : Représentation schématique des anomalies du flagelle selon la classification de David modifiée (Auger et Eustache, 2000).....	68
Figure 13 : Grille d'évaluation des anomalies morphologiques utilisée au CECOS de Toulouse.....	69

Figure 14 : Exemple de l'analyse de la cinétique des spermatozoïdes évaluée par un système automatisé d'analyse de sperme(CECOS, 2007)	73
Figure 15 : Exemples de trajectoires de spermatozoïdes humains évaluées par un système automatisé d'analyse de sperme (CECOS, 2007).	74
Figure 16 : Principe de fonctionnement du cytomètre de flux (d'après Robinson, 1999).	83
Figure 17 : Spermatozoïdes morts et vivants colorés avec le mélange SYBR et PI (Garner et Johnson, 1995).	85
Figure 18 : Test à l'acridine orange appliqué à des spermatozoïdes de taureau (Martins <i>et al.</i> , 2007).....	89
Figure 19 : Modifications morphologiques des spermatozoïdes soumis au test hypoosmotique. (D'après Jeyendran, 1984).	91
Figure 20 : Technique de suppression des spermatozoïdes liés à la zone pellucide (d'après Liu et al., 2004).....	94

Liste des tableaux.

Tableau 1 : Bilan de l'activité du CIAC de Nantes de 2001 à 2005 (d'après Boitout, V. 2007).	18
Tableau 2 : Bilan numérique des Inséminations Artificielles (IA) pratiquées au CERCA de 1999 à 2002 (d'après Bartolo, 2004).....	18
Tableau 3 : Bilan de l'activité du CERREC de Lyon de 1995 à 2001 (d'après Rostagnat, 2003).....	19
Tableau 4 : Synthèse de l'activité d'insémination artificielle bovine en France en 2006 (d'après les données statistiques de l'UNCEIA).....	21
Tableau 5 : Procréation médicalement assistée en France : données chiffrées de 1998 à 2004 (d'après Nygren et Andersen., 2001 ; Andersen <i>et al.</i> , 2004 ; Andersen <i>et al.</i> , 2006 ; Andersen <i>et al.</i> , 2008).....	25
Tableau 6 : Comparaison des durées du cycle de l'épithélium séminal et de la spermatogenèse chez le taureau, le chien et l'homme(d'après Thibault et Levasseur, 1991).....	28

Tableau 7 : Paramètres séminologiques du taureau (d'après Cupps, 1991).....	29
Tableau 8 : Volume des différentes fractions de l'éjaculat de chien (d'après Mc Donald's, 2003).....	30
Tableau 9 : Paramètres séminologiques de l'éjaculat de chien (d'après Mc Donald's, 2003).	31
Tableau 10 : Paramètres séminologiques du sperme humain (d'après Shwartz, 1983).....	31
Tableau 11 : Paramètres séminologiques chez le bovin, le chien et l'homme.....	32
Tableau 12 : Comparaison de la taille moyenne des spermatozoïdes chez le taureau, le chien et l'homme (d'après Marshall, 1990).....	34
Tableau 13 : Echelle d'appréciation de la motilité massale du sperme du chien (d'après Fontbonne, 1993).	39
Tableau 14 : Classification des anomalies du spermatozoïde de chien (d'après Freshman, 2002).....	42
Tableau 15 : Caractéristiques de l'éjaculat de qualité satisfaisante dans l'espèce canine pour l'utilisation en insémination artificielle (d'après Fontbonne, 1993).....	47
Tableau 16 : Evolution de la production de semence à la Coopelso de 1999-2000 à 2005-2006 (données Coopelso).	48
Tableau 17 : Classement du sperme en fonction de l'examen macroscopique : Recommandations de la société de Theriogenology (Elmore, 1985).....	52
Tableau 18 : Critères de notation de la motilité massale de la semence dans l'espèce bovine.	53
Tableau 19 : Critères de décision pour la conservation de l'éjaculat (d'après Dumont, 1997).	60
Tableau 20 : Nomenclature en fonction de la concentration du sperme humain (d'après Andrade-Rocha, 2003).	65
Tableau 21 : Evolution des critères de classification des anomalies morphologiques utilisés dans la classification de David et la classification de David modifiée	67
Tableau 22 : Tableau récapitulatif des méthodes utilisées en routine pour l'évaluation de la qualité de la semence dans les espèces bovine, canine et humaine.....	76

INTRODUCTION

Le succès de l'insémination artificielle dépend en grande partie de la qualité de la semence, c'est pourquoi il est important de disposer de techniques analytiques fiables permettant de l'évaluer. La meilleure méthode d'évaluation de la fertilité d'un mâle reproducteur est l'estimation du taux de gestation suite à l'insémination artificielle de femelles mais cette méthode est longue, très coûteuse et impossible à mettre en œuvre chez l'homme. C'est pourquoi de nombreuses méthodes ont été développées pour tenter d'évaluer la fertilité d'un reproducteur par l'analyse *in vitro* de sa semence.

Les différentes méthodes d'analyse de la semence tentent de caractériser des marqueurs de fertilité, c'est-à-dire des particularités des spermatozoïdes liées à leur pouvoir fécondant. Ces marqueurs doivent être corrélés à la fertilité mais également se rapprocher autant que possible des résultats d'estimation de la fertilité par le taux de gestation. Les paramètres séminologiques évalués en routine sont principalement fondés sur l'analyse macroscopique de la semence c'est-à-dire l'évaluation du volume et de l'aspect de l'échantillon (couleur, turbidité...) mais aussi sur l'analyse microscopique comprenant l'étude de la motilité, de la concentration et de la morphologie des spermatozoïdes. Ces examens sont réalisés en routine depuis plus de 50 ans et permettent de déterminer la qualité de la semence cependant cet examen de la semence reste subjectif.

Les méthodes d'analyse de la semence utilisées en routine soulèvent encore des questions de la part des professionnels. La comparaison des méthodes d'analyse de la semence dans une espèce donnée peut apporter des savoir-faire complémentaires pour les autres espèces. C'est pourquoi nous proposons dans cette thèse de comparer les méthodes d'évaluation de la qualité de la semence employées dans les espèces bovine, canine et humaine. Les objectifs, les enjeux et la finalité de l'examen du sperme sont très différents pour les trois espèces considérées.

Dans la filière bovine, l'insémination fait partie intégrante des pratiques d'élevage. Les taureaux en centre d'insémination sont des reproducteurs qui ont déjà subi une sélection, les sujets présentant des paramètres séminologiques médiocres ont donc été éliminés. De plus l'aspect zootechnique est à prendre en compte, car pour un taureau élite, le nombre de paillettes fabriquées est important pour assurer une large diffusion de son potentiel génétique.

En centre d'insémination, l'examen de routine de la semence est un contrôle qui vise à détecter des variations dans les valeurs propres à chaque animal avant d'effectuer la mise en paillettes et la congélation. Par contre, pour l'opérateur, la décision de rejet ou d'acceptation d'un éjaculat pour la congélation peut être délicate compte tenu des conséquences financières que cela implique, en particulier pour les taureaux d'élite.

Dans le cas du chien, l'examen peut intervenir dans un contexte pathologique, lors d'infertilité inexplicée mais aussi dans le cadre de l'insémination artificielle, l'examen est alors pratiqué avant la conservation du sperme par congélation ou avant l'insémination de la chienne en semence fraîche. La filière de l'insémination canine est en expansion mais reste cependant assez confidentielle en France. La semence est en général peu diffusée.

Chez l'homme, l'examen du sperme intervient dans un contexte médical et individuel. L'examen du sperme est pratiqué sur des hommes considérés comme fertiles (ayant déjà au moins un enfant) lorsqu'ils sont candidats au don de sperme. Mais le plus souvent, il est pratiqué dans un contexte pathologique lors d'infertilité masculine. Il s'agit là d'une approche individuelle et avec le développement des méthodes de Procréation Médicalement Assistée (PMA) la notion de « qualité » du sperme humain est à redéfinir. En effet, dans les conditions physiologiques il faut un grand nombre de spermatozoïdes motiles et de morphologie normale afin de féconder un ovocyte, la technique d'Injection Intra-Cytoplasmique de Spermatozoïde (ICSI) permet de féconder un ovocyte par injection directe d'un spermatozoïde dans son cytoplasme...l'intérêt d'évaluer la numération, la motilité et certaines anomalies morphologiques devient alors relatif.

Dans un premier temps, cette étude vise à décrire les méthodes d'évaluation de la qualité du sperme utilisées en pratique dans des centres spécialisés pour les espèces bovine, canine et humaine, considérés comme représentatifs de ce qui est utilisé en France. Dans un deuxième temps, elle vise à déterminer les similitudes et les différences des méthodes d'évaluation de la qualité de la semence entre espèces et les critères de conservation et d'élimination de la semence. Enfin, ce travail a pour but d'évaluer les limites de ces techniques et de discuter des améliorations techniques qui pourraient être apportées dans les années à venir. On ne prendra pas en compte la qualité microbiologique du sperme dans cette étude.

1 CONTEXTE DE L'ETUDE

1.1 *L'insémination artificielle en France : historique et état des lieux*

1.1.1 L'insémination artificielle dans l'espèce canine

L'insémination artificielle a été découverte au XVIII^{ème} siècle notamment avec la première insémination chez le chien pratiquée par l'abbé Spallanzani en 1780 et ayant conduit à la naissance de trois chiots. Au XIX et XX^{ème} siècle, des essais ont été réalisés dans le but d'améliorer la collecte et la conservation de la semence dans l'espèce canine mais les réelles avancées dans ce domaine ont eu lieu dans les années cinquante grâce au développement de l'insémination artificielle dans l'espèce bovine. La première portée obtenue par Seager à partir de semence congelée est née en 1969 aux Etats-Unis. Au cours des vingt dernières années, plusieurs travaux ont visé à améliorer le taux de réussite grâce à une meilleure conservation de la semence, une meilleure connaissance du cycle œstral de la chienne et à de meilleures techniques d'insémination (Guérin, 1997).

Compte tenu des particularités du cycle de la chienne, comportant des périodes d'œstrus tous les 6 à 7 mois, tout échec lors de la mise à la reproduction implique une perte de temps et d'argent pour l'éleveur. L'insémination artificielle peut être un outil précieux dans la gestion et l'optimisation de la reproduction en élevage canine. On compte aujourd'hui en France quatre banques de semence pour l'espèce canine. Elles sont situées à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Maisons-Alfort (Centre d'Etude en Reproduction des Carnivores : CERCA), à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes (Centre d'Insémination Artificielle Canine : CIAC), à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon (Centre d'Etude et de Recherche en Reproduction et Elevage des Carnivores : CERREC) ainsi qu'à L'Isle Jourdain (32) dans une clinique privée.

L'activité du CIAC de Nantes, montre une progression constante depuis 1996, comme l'illustre le Tableau 1. Cependant l'insémination artificielle en semence congelée n'a pas évolué dans cette structure depuis sa création. De 2001 à 2005, au maximum une insémination en semence congelée était réalisée par an.

Tableau 1 : Bilan de l'activité du CIAC de Nantes de 2001 à 2005 (d'après Boitout, V. 2007).

	Nombre de chiennes suivies	Nombre d'IA pratiquées en semence fraîche	Nombre d'IA pratiquée en semence réfrigérée	Nombre d'IA pratiquées en semence congelée
2001	128	40	1	1
2002	134	31	0	0
2003	119	51	0	0
2004	146	32	4	1
2005	164	49	3	1

Le Tableau 2 ci-dessous présente un bilan du nombre d'inséminations artificielles pratiquées au CERCA de 1999 à 2002. 557 chiennes ont été suivies au CERCA pour IA de 1999 à 2002, soit une moyenne de 139,25 chiennes par an (Bartolo, 2004). Sur la période 1994 à 1998, 480 chiennes ont été suivies au CERCA pour IA (Doucet et Vannimendus, 2001) soit une moyenne de 96 chiennes par an sur cette période. Le CERCA est la structure française la plus active concernant la pratique de l'insémination artificielle dans l'espèce canine, cependant de 1999 à 2002 seulement 109 inséminations en semence congelée ont été pratiquées, ce qui représente une moyenne de 27 interventions par an (Bartolo, 2004). De plus, après un pic de 28 inséminations en semence congelée en 2003, le nombre d'inséminations en semence congelée n'a cessé de décroître jusqu'à 12 en 2006 (Benechet, 2007).

Tableau 2 : Bilan numérique des Inséminations Artificielles (IA) pratiquées au CERCA de 1999 à 2002 (d'après Bartolo, 2004).

	Nombre d'IA pratiquées	Nombre de chiennes concernées	Nombre moyen d'IA pratiquées/ chienne
IA en semence fraîche	808	476	1,7
IA en semence réfrigérée	31	24	1,29
IA en semence congelée	109	57	1,91

Le Tableau 3 représente le bilan d'activité du CERREC de Lyon depuis son inauguration en 1995 jusqu'à 2001. De 1995 à 2001, le nombre d'inséminations en semence congelée varie de

5 à 14 par an. Avec une moyenne de 9 inséminations en semence congelée par an sur ces 7 années.

Tableau 3 : Bilan de l'activité du CERREC de Lyon de 1995 à 2001 (d'après Rostagnat, 2003).

	Nombre total d'IA	% d'IA en semence fraîche	% d'IA en semence réfrigérée	% d'IA en semence congelée
1995	35	78,8	6	15,2
1996	39	81,6	5,2	13,2
1997	55	65,5	10,9	23,6
1998	71	78,9	4,2	16,9
1999	70	78,3	1,4	20,3
2000	66	84,6	1,6	13,8
2001	85	78,8	2,4	8,8

Malgré des progrès concernant la détermination du moment optimal d'insémination et une amélioration des techniques de mise en place de la semence, le taux de réussite pour l'insémination en semence congelée est de 50,5% au CERCA (ENVA) de 2001 à 2006 (Benechet, 2007), de 66,7% au CERREC (ENVL) de 1994 à 2002 (Rostagnat, 2003) et de 50% au CIAC (ENVN) de 1996 à 2000 (Bisson, 2002).

En définitive, l'insémination artificielle en semence fraîche est pratiquée régulièrement par de nombreux vétérinaires praticiens. Cependant, à l'heure actuelle, en France, l'insémination artificielle en semence congelée reste confidentielle. En moyenne, les trois banques de semence congelée situées dans les Ecoles Nationales Vétérinaires d'Alfort, Lyon et Nantes totalisent entre 30 et 40 inséminations artificielles en semence congelée par an. Le développement d'une technique d'insémination profonde sous endoscopie et une meilleure information des éleveurs concernant les intérêts mais aussi les limites de la technique pourraient aider au développement de l'insémination artificielle dans l'espèce canine.

1.1.2 L'insémination artificielle dans l'espèce bovine

L'application de la technique de l'insémination artificielle aux grandes espèces a été plus tardive, elle fut rapportée pour la première fois par un vétérinaire praticien, le Dr Repiquet, à la société centrale de médecine en 1887. A la fin du XIX^{ième} et début du XX^{ième} siècle, les russes Ivanoff et Milovanov appliquèrent leurs travaux à différentes espèces (chevaux principalement mais aussi bovins, chiens, renards, lapins et volaille) et mirent en place la procédure technique en Russie (Foote, 2002). Les travaux sur l'insémination artificielle impliquant diverses espèces incluant les bovins se poursuivirent en Scandinavie, en Angleterre et au Japon (Foote, 2002). En France, l'insémination artificielle fut entrevue comme un procédé applicable dans les élevages bovins dans les années trente. Ce sont les vétérinaires Kleber Létard, Le Hello et Jean Blain qui ont réalisé les premières inséminations sur des bovins. En 1935, Létard présente les intérêts de l'insémination artificielle à l'occasion des journées vétérinaires d'Alfort. C'est seulement dix ans plus tard que le premier centre d'insémination artificielle bovine a vu le jour à la Loupe, en Eure et Loire en 1946 et en 1948, trente-huit centres d'insémination fonctionnaient. La principale limite au développement de l'insémination artificielle était alors la conservation de la semence car celle-ci était réfrigérée à +5°C et devait être utilisée dans un délai de trois jours. C'est à partir de 1956 que la congélation de la semence fut maîtrisée grâce à l'utilisation de glycérol, cet avènement donna un essor considérable à l'insémination artificielle à partir des années soixante-cinq. En 1964, un français, Cassou, créa la paillette de semence congelée qui sera exportée dans le monde entier (Foote, 2002).

Après la mise en place de l'organisation de l'élevage en France (loi sur l'élevage du 28 décembre 1966), le développement de l'insémination artificielle a permis un accroissement considérable du progrès génétique par la voie mâle, en effet, cette technique permet une large diffusion de la semence de géniteurs d'élite. En outre, le développement de l'insémination artificielle a profondément révolutionné les pratiques d'élevage (dans la filière laitière en particulier) et l'organisation du système d'élevage français.

En 1980, le nombre d'inséminations artificielles atteignait 130 millions dans le monde. En 1985, on chiffrait à plus de 200 millions le nombre de doses de semence produites, dont 95% en semence congelée (Vishwanath, 2003) alors qu'en 2000, il s'élevait à près de 265 millions,

avec un plus grand développement de l'activité dans les pays développés d'Europe et d'Amérique du Nord (Thibier et Wagner, 2002).

En France l'activité a connu une régression importante lors de la mise en place des quotas laitiers en 1984 et de la réduction progressive du cheptel bovin laitier (Ponsart *et al.*, 2004).

En 2006, en France, 4 079 569 inséminations artificielles ont été pratiquées dans l'espèce bovine, soit une diminution de 2,81% par rapport à 2005 et une diminution de 35,96% par rapport à 1986 (données UNCEIA).

Le Tableau 4 représente le nombre d'inséminations artificielles pratiquées en France selon le type de bovin « races laitières » ou « races bouchères ». L'insémination artificielle est beaucoup plus utilisée pour les races laitières avec plus de trois millions d'inséminations en 2006 alors qu'un million d'inséminations ont été pratiquées dans les races bouchères. Cependant, globalement, le nombre d'inséminations dans les races laitières subit une forte diminution alors qu'il augmente dans les races bouchères.

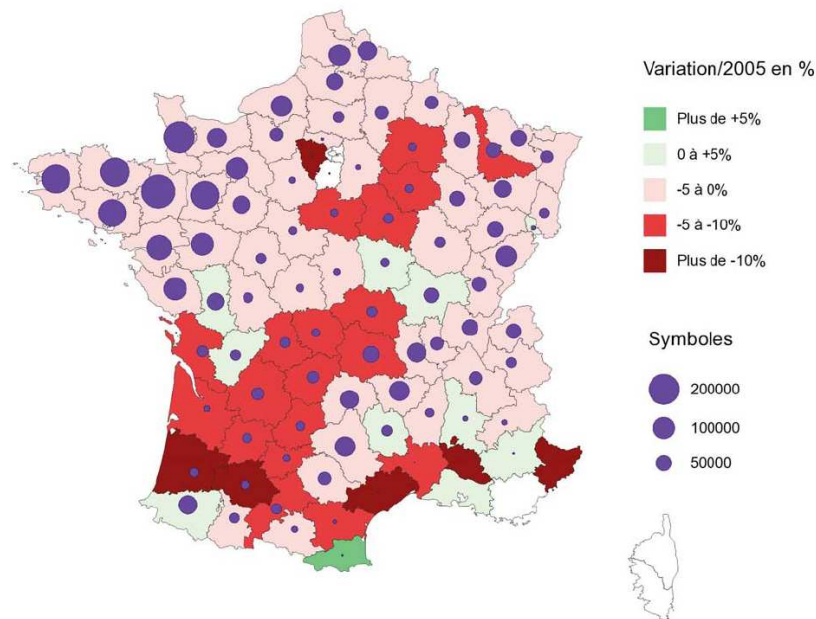
Tableau 4 : Synthèse de l'activité d'insémination artificielle bovine en France en 2006 (d'après les données statistiques de l'UNCEIA).

	Races laitières		Races bouchères	
	2006	% par rapport à 2005	2006	% par rapport à 2005
Taureaux utilisés	3 013 262	-3,57	1 066 307	-0,61
Femelles inséminées	2 979 485	-3,50	581 502	+3,99

83,7% des inséminations sont pratiquées sur des vaches laitières et 16,3% sont pratiquées sur des vaches allaitantes en France.

La Figure 1 représente la répartition par département des inséminations artificielles pratiquées en France en 2006.

Figure 1 : Inséminations artificielles bovines par département en 2006 (d'après les données de l'UNCEIA).



Les zones où l'activité Insémination Artificielle bovine est la plus importante correspondent aux grands bassins laitiers, la Bretagne et la Normandie. A contrario, l'Ile-de-France et les départements du bassin Méditerranéen utilisent peu l'insémination artificielle. Globalement on constate une diminution du nombre d'inséminations artificielles pratiquées sur le territoire français, cette baisse est particulièrement marquée dans le Sud-Ouest (le Gers et les Landes enregistrant une diminution de plus de 10%) et le centre de la France.

Avant 2007 il existait 46 centres d'insémination artificielle en France. L'Union Nationale des CEIA (UNCEIA) a une mission de fédération des CEIA. L'UNCEIA a également une mission de recherche appliquée et dispose d'un département spécialisé dans les biotechnologies de la reproduction. Dans le service Andrologie de l'UNCEIA, la qualité du sperme animal fait l'objet d'approches multiples visant à en optimiser la fécondance en améliorant les conditions de production, de sélection, de dilution et de conservation. De nouveaux programmes de Recherche et Développement sont menés avec pour objectif principal l'amélioration de la fertilité des taureaux d'insémination. En ce qui concerne la fertilité du mâle, l'UNCEIA travaille actuellement sur la recherche d'un prédicteur de fertilité, l'amélioration de la congélation de la semence (utilisation d'anti-oxydant...etc), le tri de la semence X/Y et un programme fondamental concernant l'amélioration génétique des animaux d'élevage ayant

conduit notamment à la découverte de 3 QTL (Quantitative Trait Loci) reliés à la fertilité, à la quantité et à la qualité des spermatozoïdes.

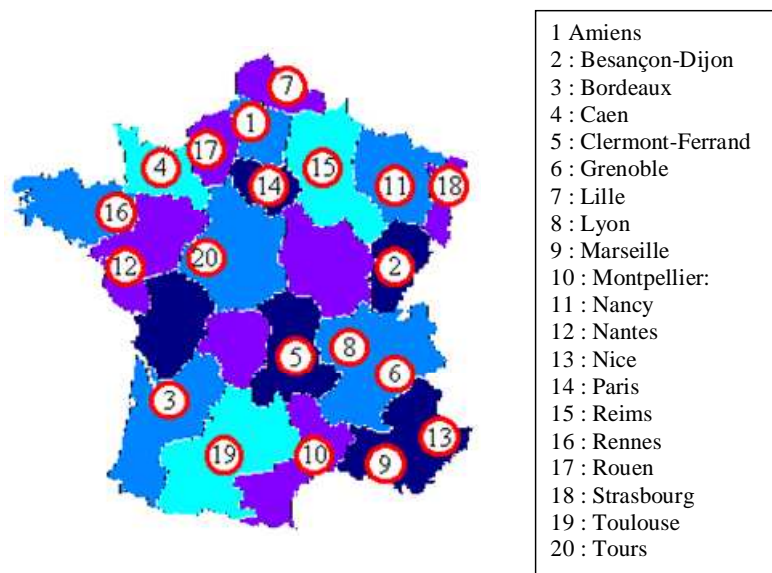
La filière de l'insémination artificielle animale est en profonde restructuration depuis le 1^{er} janvier 2007 avec l'entrée en vigueur de l'application de la législation zootechnique européenne, la disparition du monopole de zone (ouverture à la concurrence) et les modifications des modalités de préparation et de distribution de la semence. En effet, jusqu'en janvier 2007, la sélection génétique et l'insémination artificielle étaient régies par la loi sur l'élevage de 1966. La loi d'orientation agricole du 5 janvier 2006 (loi 2006-11 du 5 janvier 2006 d'orientation agricole) a décrit les contours d'une grande réforme de l'élevage qui a été précisée dans les ordonnances décrets et arrêtés parus en décembre 2006. Les particularités françaises, à savoir l'absence de concurrence pour l'approvisionnement en doses de semence et pour leur distribution (monopole de zone des CEIA) étaient en contradiction avec l'ouverture européenne. C'est pourquoi un nouveau cadre légal qui libéralise l'insémination artificielle a été mis en place en 2006. Ainsi le monopole de zone a disparu et, sous certaines conditions zootechniques et sanitaires, des « entreprises de sélection » et des « entreprises de mise en place » peuvent désormais voir le jour. Cependant, la nouvelle loi préserve le système national d'information génétique avec les Etablissements Départementaux d'Elevage (EDE), les Associations Régionales au Service des Organismes d'Elevage (ARSOE) et les contrôles de performances. Ces profondes modifications du cadre réglementaire vont entraîner, avec la libéralisation du marché, une segmentation et une diversification des services proposés dans le domaine de l'insémination artificielle bovine.

1.1.3 L'insémination artificielle chez l'homme

Chez l'homme, des essais d'insémination artificielle ont été réalisés à la fin du XVIII^{ième} siècle, conjointement par un anglais, J. Hunter et par un français, MA Thouret qui fut le premier à publier un petit ouvrage très complet sur la technique, les indications et les premiers résultats. Cependant, des considérations religieuses ont freiné le développement de l'insémination artificielle. Ainsi c'est seulement en 1973 que furent créées les deux premières banques de sperme en France, dans le cadre des hôpitaux de Paris.

Ensuite, progressivement, s'est mis en place le « système CECOS (Centre d'Etude et de Conservation des Œufs et du Spermé humains) », en effet, l'adoption par chacun des nouveaux centres des principes, notamment des principes éthiques et de politique scientifique, a instauré un esprit communautaire, avec un besoin de plus en plus fort d'échanges et de comparaison entre les centres. Cela a abouti en 1981 à la création d'une Fédération Française des CECOS. Cette structure a permis l'harmonisation et la cohésion des CECOS tout en préservant leur autonomie. On recense aujourd'hui 20 centres CECOS repartis sur le territoire français (Figure 2).

Figure 2 : Liste des centres habilités pour le don de sperme en France.



Depuis sa création, le système CECOS a connu un constant développement, à la fin de 1988, 19232 conceptions avaient été permises grâce à la contribution de 7443 donneurs.

Le Tableau 5 présente l'évolution de l'activité de Procréation Médicalement Assistée (PMA) de 1998 à 2004. **La PMA a connu un grand développement depuis les années 80.** En 2004, 23926 cycles de Fécondation In Vitro (FIV) et 31291 cycles d'Injection Intra Cytoplasmique de Spermatozoïde (ICSI) ont été pratiqués. De 1998 à 2004 le nombre de cycle FIV reste relativement stable, cependant on assiste à un développement important de l'ICSI, en effet, en 6 ans le nombre d'ICSI pratiquées en France a pratiquement doublé.

Le nombre d'interventions de Procréation Médicalement Assistée (PMA) pratiquées en France est le plus important des pays européens cependant seulement 1,7% des enfants nés en 2004 sont issus de la PMA, ce pourcentage est plus élevé dans les pays Scandinaves et en Islande (Andersen *et al.*, 2008).

Tableau 5 : Procréation médicalement assistée en France : données chiffrées de 1998 à 2004 (d'après Nygren et Andersen., 2001 ; Andersen *et al.*, 2004 ; Andersen *et al.*, 2006 ; Andersen *et al.*, 2008).

	1998	2000	2002	2004
Nombre de cycles FIV pratiqués	21831	23347	21557	23926
Nombre de cycles ICSI pratiqués	17583	23228	25522	31291
Nombre d'accouchements suite à PMA	7531	8357	9693	10460
% d'enfants nés grâce à la PMA / total enfants nés	1,29%	1,4%	1,5%	1,7%

2 PHYSIOLOGIE DE LA REPRODUCTION ET PARAMETRES SEMINOLOGIQUES

2.1 Puberté et spermatogénèse

2.1.1 Puberté

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

Chez le taureau, la puberté est plus tardive pour les races allaitantes que pour les races laitières. En moyenne, la puberté apparaît entre 10 et 12 mois (Gordon, 1996). L'évaluation de la fonction sexuelle des futurs taureaux reproducteurs intervient à l'âge de 12 mois environ. Les taureaux sont évalués sur la qualité de l'éjaculat ainsi que sur la circonférence scrotale. La capacité reproductrice et la production de semence sont maximales aux alentours de 4 ans.

La puberté survient en moyenne à 6 -7 mois chez le chien. Les chiens de petites races sont pubères plus tôt (dès 4 mois) que les chiens de grandes races qui peuvent n'atteindre la puberté qu'à l'âge de 22 mois. Après la puberté, le chien mâle est capable de s'accoupler et de produire des éjaculats fertiles toute l'année.

Chez l'homme la puberté, intervient entre 12 et 18 ans, elle est considérée comme une phase transitoire entre l'enfance et l'âge adulte.

2.1.2 Spermatogénèse

La spermatogénèse est le processus de division et de différenciation cellulaire par lequel les spermatozoïdes sont produits à partir des spermatogonies situées dans les tubes séminifères des testicules. Le cycle de l'épithélium séminal correspond l'intervalle régulier de temps qui rythme l'entrée en spermatogénèse des cellules souche de renouvellement.

Chez le taureau, la spermatogénèse dure 54 jours et le cycle de l'épithélium séminal 13,5 jours, ces valeurs sont très similaires chez le chien. Chez l'homme, par contre ces processus sont plus longs : la spermatogénèse dure 74 jours et le cycle de l'épithélium séminal 16 jours (Tableau 6).

Tableau 6 : Comparaison des durées du cycle de l'épithélium séminal et de la spermatogénèse chez le taureau, le chien et l'homme(d'après Thibault et Levasseur, 1991).

Espèces	Durées (jours)	
	Cycle de l'épithélium séminal	Spermatogénèse
Taureau	13,5	54
Chien	13,6	54,4
Homme	16	74

Chez le taureau sexuellement mature, la production de spermatozoïdes est de 12 millions par gramme de testicule et par jour ; chez le chien elle est de 20 à 28 millions par gramme de testicule et par jour et chez l'homme, à l'âge de 20 ans, la production de spermatozoïdes est de l'ordre de 6,5 millions de spermatozoïdes par jour et par gramme de testicule (Thibault et Levasseur, 2001). La production de spermatozoïdes diminue avec l'âge, de façon équivalente chez toutes les espèces, mais cette diminution affecte surtout l'homme en raison de son niveau relativement bas de production spermatique.

2.2 Caractéristiques de l'éjaculation et de l'éjaculat

2.2.1 Bovin

Dans l'espèce bovine, l'éjaculation est concomitante de la poussée violente (coup de rein) qui introduit le pénis extériorisé dans le vagin de la femelle. Pour un taureau normal, le temps qui sépare le premier contact du gland du pénis avec les parois du vagin et l'éjaculation varie d'une fraction de seconde à 2 secondes. L'éjaculation est induite par la température vulvo-vaginale, et la pression sur le pénis. C'est pourquoi, la collecte de la semence utilisée en centre d'insémination artificielle est réalisée avec un vagin artificiel qui reproduit les sensations physiologiques du contact avec le vagin de la vache (température et pression).

Le Tableau 7 présente les paramètres séminologiques de l'éjaculat de taureau.

Tableau 7 : Paramètres séminologiques du taureau (d'après Cupps, 1991).

	Paramètres séminologiques
Volume (ml)	2 – 10
Concentration en spermatozoïdes (x 10⁶/ml)	300 – 2000
Mobilité moyenne	70% de spermatozoïdes mobiles
pH	6,48 – 6,99

2.2.2 Chien

Une des particularités physiologiques du chien est que l'éjaculat est émis en trois fractions. Suite à une période de mouvements du bassin répétés et à l'émission de la première phase de l'éjaculat, l'insertion complète du pénis dans le vagin de la chienne est rapidement suivie par l'éjaculation de la seconde fraction. Ensuite le mâle effectue une rotation en passant l'un des membres pelviens au dessus du dos de la chienne, cela entraîne une torsion à 180° de la base du pénis. Les animaux restent ainsi bloqués pendant 5 à 30 minutes au cours desquelles la fraction prostatique de l'éjaculat est émise (Burke, 1986).

La première fraction, appelée fraction pré-spermatique, est de faible volume, de couleur claire, pratiquement translucide et contient très peu de spermatozoïdes. La seconde fraction

est appelée fraction spermatique, il s'agit de la fraction riche en spermatozoïdes. Elle est de faible volume, d'apparence laiteuse et contient la majorité des spermatozoïdes libérés au cours de l'éjaculation. Ces deux premières fractions sont libérées au cours des 2 ou 3 premières minutes de la phase d'éjaculation. La troisième fraction, ou fraction post-spermatique est la plus volumineuse, elle peut contenir quelques spermatozoïdes, et nécessite de 3 à 40 minutes pour être émise. La plus grande partie du volume des fractions pré et post-spermatiques est générée par la prostate.

Les volumes moyens des trois fractions de l'éjaculat de chien sont détaillés dans le tableau ci-dessous (Tableau 8).

Tableau 8 : Volume des différentes fractions de l'éjaculat de chien (d'après Mc Donald's, 2003).

Fraction	Volume (ml)	
	Moyenne	Etendue
Pré-spermatique	0,8	0,25 – 2,8
Spermatique	0,6	0,4 – 2,0
Post-spermatique	4,0	1,1 – 16, 3
Ejaculat total	5,4	1,75 – 21,1

Les valeurs présentées dans ce tableau sont issues de données collectées pour un chien de taille moyenne (beagle), les volumes varient en fonction de la taille de l'animal.

Le Tableau 9 détaille les paramètres séminologiques de l'éjaculat du chien de race beagle.

Tableau 9 : Paramètres séminologiques de l'éjaculat de chien (d'après Mc Donald's, 2003).

Paramètre	Moyenne ± Ecart-type	Etendue
Volume (ml)	3,1 ± 0,3	2,8 – 3,4
Motilité (note de 0 à 5)	3,0 ± 0,3	2,2 – 3,9
Densité (note de 0 à 5)	1,5 ± 1,1	0,0 – 4,2
Concentration en spermatozoïdes (10 ⁶ /ml)	111 ± 22	57 – 164
Nombre de spermatozoïdes par éjaculat (en millions)	301 ± 60	154 – 449
Pourcentage de spermatozoïdes vivants	90 ± 2	84 – 95
Pourcentage de spermatozoïdes anormaux	7 ± 1	3 – 10

2.2.3 Homme

Le Tableau 10 présente les paramètres séminologiques pour des éjaculats recueillis après au maximum 5 jours d'abstinence (Shwartz, 1983).

Tableau 10 : Paramètres séminologiques du sperme humain (d'après Shwartz, 1983).

	Concentration (10 ⁶ /ml)	Volume (ml)	Motilité (%)	Formes normales (%)
Moyenne ±Ecart-type	96 ± 65,9	3,7 ± 1,9	70,3 ± 10	60,2 ± 11,2

Ce tableau permet de constater que les paramètres séminologiques des éjaculats humains présentent une très grande variabilité, à la fois intra-individuelle (dépendant notamment du délai d'abstinence) et inter-individuelle.

Le Tableau 11 récapitule les paramètres séminologiques chez le taureau, le chien et l'homme. Le volume, la concentration, le nombre de spermatozoïdes ainsi que le pourcentage de spermatozoïdes normaux et mobiles sont indiqués. On remarque notamment que les concentrations moyennes des éjaculats sont très variables selon les espèces et varient d'une

concentration de $1000 \cdot 10^6/\text{ml}$ chez le taureau à $96 \cdot 10^6/\text{ml}$ chez l'homme. Chez le chien les valeurs sont intermédiaires avec une concentration moyenne de $300 \cdot 10^6/\text{ml}$.

Tableau 11 : Paramètres séminologiques chez le bovin, le chien et l'homme.

Espèce	Volume moyen de l'éjaculat	Concentration moyenne de l'éjaculat ($10^6/\text{ml}$)	Nombre moyen de spermatozoïdes par éjaculat	% de spermatozoïdes mobiles	% de spermatozoïdes normaux
Taureau race laitière (Cupps, 1991)	6 ml	1200	7000×10^6	70%	89%
Taureau race allaitante (Cupps, 1991)	4 ml	1000	4000×10^6	65%	80%
Chien (d'après Cupps, 1991)	5 ml	300	1500×10^6	85%	80%
Homme (Shwartz, 1983)	3,7 ml	96	$355,2 \times 10^6$	70,3%	60,2%

2.3 Caractéristiques morphologiques du spermatozoïde

2.3.1 Bovin

Le spermatozoïde normal mesure environ $70 \mu\text{m}$ chez le taureau. La tête du spermatozoïde est de forme ovoïde et aplatie, elle mesure 8 à $9 \mu\text{m}$ de longueur, 4 à $4,5 \mu\text{m}$ de largeur et $0,5$ à $1 \mu\text{m}$ d'épaisseur. L'acrosome couvre environ 60% de la tête et forme sur le bord antérieur une crête apicale, sorte de bourrelet. La pièce intermédiaire fixée à la tête, forme un cylindre d'environ 10 à $12 \mu\text{m}$ de long et d'un diamètre de $1 \mu\text{m}$. Le flagelle mesure de 52 à $55 \mu\text{m}$ de longueur pour un diamètre de $0,5 \mu\text{m}$ et se termine par une section filamenteuse de $0,2 \mu\text{m}$ de diamètre (Bahr et Zeitler, 1964).

2.3.2 Chien

Le spermatozoïde de chien mesure de 62 à 66 μm . La tête du spermatozoïde mesure de 4 à 5 μm . Elle est aplatie dorso-ventralement, le spermatozoïde observé de profil apparaît donc aplati par rapport au spermatozoïde observé de face. L'acrosome qui recouvre la tête sur sa partie antérieure a un aspect « en bonnet ». La région étranglée qui relie la tête à la pièce intermédiaire est le « col ». La pièce intermédiaire est l'unité motrice du spermatozoïde et mesure de 6 à 6,6 μm . Le flagelle est l'élément propulseur et mesure environ 55 μm (Fontbonne, 1993).

2.3.3 Homme

Le spermatozoïde « normal » est difficile à définir. L'étude de spermatozoïdes récupérés après migration dans le mucus cervical pré-ovulatoire a permis de définir les caractéristiques du spermatozoïde normal (Auger et Eustache, 2000). En effet, les spermatozoïdes anormaux sont retenus par le filtre que constitue la glaire cervicale.

La tête du spermatozoïde normal mesure entre 2,5 et 3,5 μm de large pour 4 à 5,5 μm de long (Katz et *al.*, 1986). La région acrosomique représente 40 à 70 % de la surface de la tête et elle est nettement définie. La pièce intermédiaire normale, peu visible en microscopie conventionnelle, mesure de 1,5 à 1,9 fois la longueur de la tête, et présente un diamètre de 0,6 à 0,8 μm . Son grand axe est dans le prolongement du grand axe de la tête et présente un contour régulier, une texture homogène et un reste cytoplasmique de taille minimale à son niveau n'est pas considéré comme anormal. Il est en effet reconnu que les restes cytoplasmiques ne doivent pas dépasser en surface, le tiers de la surface normale de la tête (Auger et Jouannet, 1993). Enfin, la pièce principale, c'est-à-dire le reste du flagelle, mesure environ 45 μm (soit environ 10 fois la longueur de la tête), pour un diamètre de l'ordre de 0,4 à 0,5 μm . Elle est développée avec un contour régulier et un aspect homogène.

Le Tableau 12 récapitule de façon comparative les tailles moyennes des différentes sections du spermatozoïde chez le taureau, le chien et l'homme.

Tableau 12 : Comparaison de la taille moyenne des spermatozoïdes chez le taureau, le chien et l'homme (d'après Marshall, 1990).

Espèce	Longueur de la tête (µm)	Longueur de la pièce intermédiaire (µm)	Longueur totale (µm)
Taureau	6,8	9,8	53,5
Chien	5,6	-	55,3
Homme	6,1	4,7	58,4

3 PARTIE DESCRIPTIVE : ETAT DES LIEUX DES METHODES D'EVALUATION DE LA QUALITE DU SPERME DANS LES DIFFERENTES ESPECES

3.1 Evaluation de la qualité de la semence dans l'espèce canine

3.1.1 Contexte et lieu d'étude

Afin de décrire les méthodes d'analyse réalisées en routine sur la semence canine, je me suis rendue au Centre d'Etude en Reproduction des Carnivores (CERCA), situé à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Maisons-Alfort. Ce lieu est considéré comme représentatif des méthodes utilisées en France. Bien qu'il n'y ait officiellement pas de standardisation des techniques d'examen du sperme chez les carnivores domestiques, les représentants des quatre banques de sperme se réunissent chaque année pour harmoniser les pratiques.

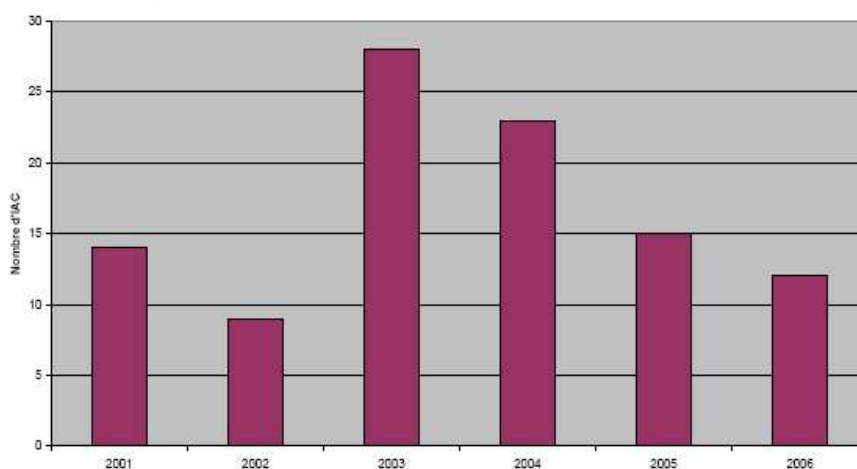
La première « Banque de semence canine » a été créée en 1981 et a été rattachée au service de Pathologie de la reproduction en 1986. Ses activités s'étant largement diversifiées, elle a été rebaptisée CERCA en 1989 (Centre d'Etudes en Reproduction Canine Assistée). En 1997, ce service a rejoint le pôle de l'UMES (Unité de Médecine de l'Elevage et du Sport) dont il constitue l'antenne « reproduction ». Par la suite, les activités du CERCA ont été élargies aux autres carnivores : chat, furet et carnivores sauvages, CERCA signifie alors Centre d'Etude en Reproduction des Carnivores.

Les locaux du CERCA sont situés au sein de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Maisons-Alfort et comprennent : une salle d'attente, une salle de consultation, un laboratoire, une banque de semence canine et féline et une salle de travail pour les étudiants. Cinq vétérinaires travaillent au CERCA mais également dans le reste des cliniques de reproduction des carnivores (consultation, bloc, échographie...), une auxiliaire spécialisée vétérinaire (ASV) est également employée par le CERCA. Les moyens financiers proviennent des prestations et de contrats avec des firmes pharmaceutiques. Le CERCA accueille des internes un jour et demi par semaine et des étudiants de deuxième et troisième cycle quotidiennement. L'opérateur

effectuant les analyses de semence change fréquemment deux fois par jour et au moins tous les jours (rotation des cliniciens). En général, ce sont des vétérinaires qui procèdent à l'examen de la semence, très rarement l'ASV. La formation des opérateurs est assurée sur place par un « sénior ». Le CERCA assure en moyenne 5 à 10 consultations par jour. Les activités consistent en des suivis de chaleur des femelles, des inséminations artificielles en semence fraîche, réfrigérée, ou congelée, des congélations de semence, des dosages hormonaux (en collaboration avec l'unité d'endocrinologie), des bilans de fertilité (échographies génitales, spermogrammes, suivis d'ovulation et de gestation...). Il est à noter que 80% de la clientèle du CERCA est constituée d'éleveurs de chiens ou de chats (majoritairement habitants de la région Ile-de-France). Le CERCA effectue en moyenne une quinzaine d'examen de la semence chaque semaine. Six à huit des éjaculats analysés sont destinés à la congélation, le reste est destiné à l'insémination artificielle en semence fraîche ou à des examens dans le cadre de bilans d'infertilité. L'examen standard de la semence nécessite 15 minutes. Une centaine d'inséminations artificielles environ sont pratiquées annuellement en semence fraîche et une trentaine environ en semence congelée ou réfrigérée.

La Figure 3 présente le bilan de l'activité du CERCA de 2001 à 2006. On remarque une diminution du nombre d'inséminations artificielles en semence congelée (IAC) pratiquées au CERCA de 2003 à 2006. Cette diminution d'activité est concomitante à la diminution du taux de réussite des IAC.

Figure 3 : Nombre d'inséminations artificielles en semence congelée pratiquées au CERCA de 2001 à 2006 (Benechet, 2007).



L'IA est pratiquée par voie intra-vaginale ou par voie intra-utérine. Cette dernière voie est utilisée dans la mesure du possible et systématiquement employée dans le cas d'insémination artificielle en semence congelée (car le pouvoir fécondant de la semence congelée n'est que de 12 à 24 heures). Depuis 2001, pour chaque chienne inséminée, la voie intra-utérine est tentée après une éventuelle tranquillisation et la voie intra-vaginale n'est pratiquée qu'en cas d'échec.

3.1.2 Examen du sperme

La collecte du sperme est effectuée dans la salle de consultation du CERCA. Généralement, le sperme est collecté par massage des bulbes érectiles, cette technique entraîne l'érection puis l'éjaculation. Le sperme est ensuite recueilli grâce à l'utilisation de cônes de prélèvement reliés à un tube plastique gradué et incassable. Ces tubes sont stériles et à usage unique. Tout le matériel destiné au prélèvement est propre (et rincé pour éviter toute action spermicide des savons ou détergents) voire stérile. Le prélèvement du sperme se fait avec ou sans femelle en chaleur à proximité. Les trois phases de la semence sont récoltées séparément.

3.1.2.1 Analyse macroscopique

Les trois phases sont observées macroscopiquement, car toute modification importante peut être révélatrice d'une pathologie du tractus génital se traduisant éventuellement par une diminution de la fertilité voire une infertilité. Le volume de l'éjaculat, la couleur et la turbidité de l'éjaculat sont notés.

La phase pré-spermatique possède un rôle lubrifiant, elle doit être translucide (plus ou moins trouble) et acellulaire. Son volume varie de 0,5 à 5ml.

La phase spermatique est de couleur laiteuse, elle contient les spermatozoïdes. Son volume varie de 1 à 4 ml environ. L'aspect de cette fraction permet de déterminer approximativement sa concentration en spermatozoïdes :

- translucide : absence ou peu de spermatozoïdes ;
- Blanchâtre ou nuageux : présence de spermatozoïdes ; l'opacité est fonction de la concentration ;
- Blanc laiteux : concentration importante de spermatozoïdes;

- Rosé : présence de sang (Fontbonne, 1993).

La phase post-spermatique est de couleur claire et joue le rôle de diluant, son volume est important. Cette phase représente 1 à 80 ml.

Les principales anomalies macroscopiques consistent en l'absence de sperme, la présence de pus, d'urine ou de sang dans le sperme. Une coloration jaunâtre peut être le signe d'une contamination par de l'urine ou du pus alors qu'une contamination par du sang se traduit par une coloration rosée à brunâtre. La contamination du sperme par ces éléments peut atteindre les trois fractions ou uniquement la fraction prostatique, d'où la nécessité de bien séparer les différentes phases.

Le volume de l'éjaculat recueilli est mesuré par lecture directe sur le tube gradué servant à la collecte. La connaissance de ce volume permettra de calculer le nombre total de spermatozoïdes de l'éjaculat.

3.1.2.2 Analyse microscopique

L'analyse microscopique est pratiquée sur la phase spermatique, le prélèvement de la totalité de l'éjaculat est inutile pour cet examen car le recueil d'un trop grand volume a pour conséquence une dilution des spermatozoïdes.

a) Motilité

Cet examen est réalisé le plus rapidement possible après la récolte du sperme. Il s'agit d'un examen dynamique qui s'effectue sur une platine chauffée à 37°C pour éviter le ralentissement des spermatozoïdes. On observe en premier lieu la motilité massale, sur une goutte de sperme déposée sur une lame et observée à faible grossissement (x 100) et les mouvements de réunion et de dispersion des gamètes sont observés. Ils forment des « vagues » à la surface de la goutte. L'intensité des vagues provoquées par le mouvement des spermatozoïdes est évaluée. Une note de 0 à 5 est attribuée à l'échantillon observé, selon une échelle de notation telle que celle proposée dans le Tableau 13.

Tableau 13 : Echelle d'appréciation de la motilité massale du sperme du chien (d'après Fontbonne, 1993).

ECHELLE D'APPRECIATION DE LA MOTILITE MASSALE DU SPERME DE CHIEN	
Note	Interprétation
0	Aucun mouvement.
1	Les spermatozoïdes bougent sans former de mouvement d'ensemble.
2	Les spermatozoïdes ébauchent des mouvements d'ensemble circulaires
3	Les mouvements d'ensemble représentent des cercles centrés sur eux-mêmes.
4	Les spermatozoïdes ont un mouvement d'ensemble. Ils forment des vagues rondes qui se déplacent.
5	Les mouvements d'ensemble se densifient. Les spermatozoïdes bougent en tous sens

Cette observation est simple, peu coûteuse, mais peu précise ; elle dépend à la fois des mouvements des spermatozoïdes mais aussi de la concentration de l'échantillon. De plus, cette méthode est subjective, la note de 0 à 5 est semi-quantitative. L'opérateur doit donc être expérimenté et pratiquer régulièrement cette technique.

Dans un second temps, la motilité individuelle est déterminée. Le principe est d'examiner, à fort grossissement (x 400), une goutte de sperme déposée sur une lame et recouverte d'une lamelle. Le sperme doit être relativement peu concentré, afin que chaque spermatozoïde soit individualisable. Dans l'espèce canine en général, il n'est pas nécessaire de diluer le sperme au préalable, cependant, si la concentration est élevée, il est possible de le diluer dans une solution de NaCl isotonique tiédie à 37°C. Le pourcentage de spermatozoïdes mobiles est évalué de façon subjective. Les spermatozoïdes progressant en ligne droite (on parle alors de mobilité fléchante) sont distingués des spermatozoïdes tournant en rond, à mobilité faible ou diminuée. Au CERCA, pour l'espèce canine, il est considéré qu'un sperme de bonne qualité possède 70% ou plus de spermatozoïdes mobiles. La vitesse ou la qualité de la motilité peut aussi être évaluée ; on considère qu'un spermatozoïde de chien avec une motilité normale doit traverser le champ du microscope en 2 à 3 secondes (Root, 2007). De plus, chez le chien, le pourcentage de spermatozoïdes fléchants est positivement corrélé au pourcentage de spermatozoïdes morphologiquement normaux (Pasqualotto, 2005).

Actuellement il existe des techniques automatisées d'analyse d'image qui permettent l'examen de la motilité des spermatozoïdes. Cependant, compte tenu de leur prix, ces techniques assistées par ordinateur ne sont pas utilisées en routine dans l'espèce canine.

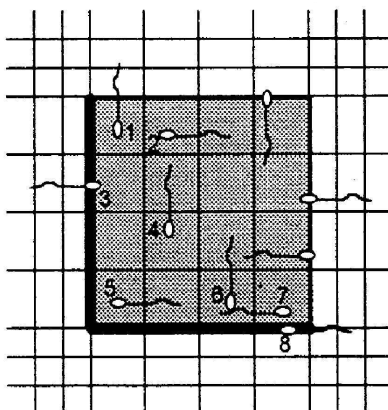
b) Numération

Des techniques automatisées (au spectrophotomètre) permettent le comptage des spermatozoïdes mais la technique la plus employée et la moins onéreuse reste le comptage manuel à l'aide de cellules hématimétriques. Au CERCA, des cellules de Thoma sont employées pour la numération, nous développerons donc cette méthode. Cependant, des cellules de Malassez, de Neubauer ou d'autre type conviennent tout aussi bien, il suffit d'adapter les dilutions et le calcul au volume de la cellule employée.

La dilution est adaptée à la concentration initiale du sperme, ainsi, si le sperme est très peu concentré (translucide), une dilution au $1/10^{\text{ième}}$ ou $1/20^{\text{ième}}$ sera effectuée. Par contre si le sperme est concentré (aspect laiteux) une dilution au $1/100^{\text{ième}}$ ou $1/200^{\text{ième}}$ sera préférable. La dilution se fait avec une solution de chlorure de sodium hypertonique à 3%, cette solution hypertonique engendre la mort des spermatozoïdes sans provoquer leur lyse. Ainsi, les spermatozoïdes sont immobiles et le comptage est facilité. Après homogénéisation du mélange, la solution est déposée à l'aide d'une micropipette afin de remplir par capillarité, sans bulle d'air, la chambre de l'hématimètre. Il faut alors laisser sédimenter pendant quelques minutes avant de procéder au comptage des spermatozoïdes.

Avant le comptage, il faut bien vérifier à faible grossissement, que la répartition des éléments soit homogène, au moindre doute, le mélange sera homogénéisé de nouveau et le montage recommencé. Après repérage des limites de la cellule (grossissement $\times 100$), les éléments sont comptés au microscope au grossissement $\times 400$. La lame est balayée de façon méthodique, de gauche à droite et du haut vers le bas. En général les spermatozoïdes sont comptés sur 5 grands carrés. Afin d'éviter de surévaluer le nombre de spermatozoïdes, pour les éléments situés entre deux carrés, ne sont comptés que ceux qui sont à cheval sur les graduations, en général celles formant la lettre L (Figure 4).

Figure 4 : Comptage des spermatozoïdes à la cellule de Thoma; prise en compte des éléments « à cheval » sur les graduations.



Le principe général du calcul du nombre de spermatozoïdes figure dans la formule énoncée ci-dessous :

$$\frac{(\text{Nombre de spermatozoïdes comptés} \times \text{facteur de dilution})}{(\text{Surface considérée (mm}^2\text{)} \times \text{profondeur des chambres})} = \text{spermatozoïdes par ml de semence}$$

Le CERCA dispose également d'un appareil portable, l'ACCUREAD® IMV Technologies, pour évaluer la concentration de la semence. Il s'agit d'un instrument basé sur le principe de la mesure de turbidimétrie. Les mesures sont obtenues grâce à l'association d'une source lumineuse de type Diode Electro Luminescente qui émet à 595 nm et d'une fibre optique conduisant le signal lumineux jusqu'au détecteur. Cet appareil a été validé initialement pour la mesure de la concentration en spermatozoïdes dans le sperme bovin puis le principe a été élargi à d'autres espèces, dont l'espèce canine grâce à la détermination par le constructeur des équations de paramétrage adaptées. Cet appareil présente une bonne répétabilité et une bonne fiabilité (il présente, selon le constructeur, une meilleure fiabilité et une meilleure répétabilité que la spectrophotométrie). Le prix de l'Accuread® est de 990 euros (prix indiqué pour le mois de décembre 2007), auxquels il faut rajouter le petit matériel nécessaire à son fonctionnement (cuves, pipettes, cônes et filtres).

c) Morphologie des spermatozoïdes

La morphologie des spermatozoïdes doit être prise en compte dans l'analyse de la semence chez le chien. **Un éjaculat contenant plus de 30% de formes anormales est considéré comme anormal (Oettle, 1993).** Les formes anormales sont classées en deux catégories selon

qu'elles sont considérées comme primaires (c'est-à-dire les anomalies résultant d'un défaut de la spermatogenèse) ou secondaires (survenant lors de la maturation ou de la préparation de la lame). Le Tableau 14 présente la liste des anomalies primaires et secondaires dans l'espèce canine. La classification en anomalies majeures et mineures peut également être utilisée mais cette dernière classification est plus délicate à utiliser car elle suppose une connaissance des conséquences des défauts morphologiques sur la fertilité dans l'espèce canine (Root, 2007).

Tableau 14 : Classification des anomalies du spermatozoïde de chien (d'après Freshman, 2002).

ANOMALIES DU SPERMATOZOÏDE		
	Anomalies primaires	Anomalies secondaires
Anomalies de tête	Tête piriforme Tête amincie Tête allongée Tête petite (microcéphalie) Tête géante (macrocéphale) Tête ronde Tête déformée Tête double	Tête détachée
Anomalies de la pièce intermédiaire	Pièce intermédiaire double Pièce intermédiaire enflée Gouttelettes cytoplasmiques proximales	Gouttelettes cytoplasmiques distales
Anomalies de queue	Queue double Queue cassée Queue enroulée en chignon ou enroulées autour de la tête	Queue tordue Queue enroulée distalement Queue repliée
Autres anomalies		Acrosomes anormaux

En pratique, on effectue une coloration en éosine-nigrosine ou une coloration grâce au réactif de Harris-Shore ou encore au Spermac® qui est une préparation commerciale. Pour une coloration à l'éosine-nigrosine, une goutte de semence est mélangée à deux gouttes d'éosine-nigrosine. Ensuite, l'étalement est effectué au moyen d'une lame rodée inclinée à 45° et la lame est séchée à l'air libre par agitation. La lame est ensuite observée au grossissement x1000 à immersion. Il convient de noter les anomalies sur au moins 200 spermatozoïdes. Si

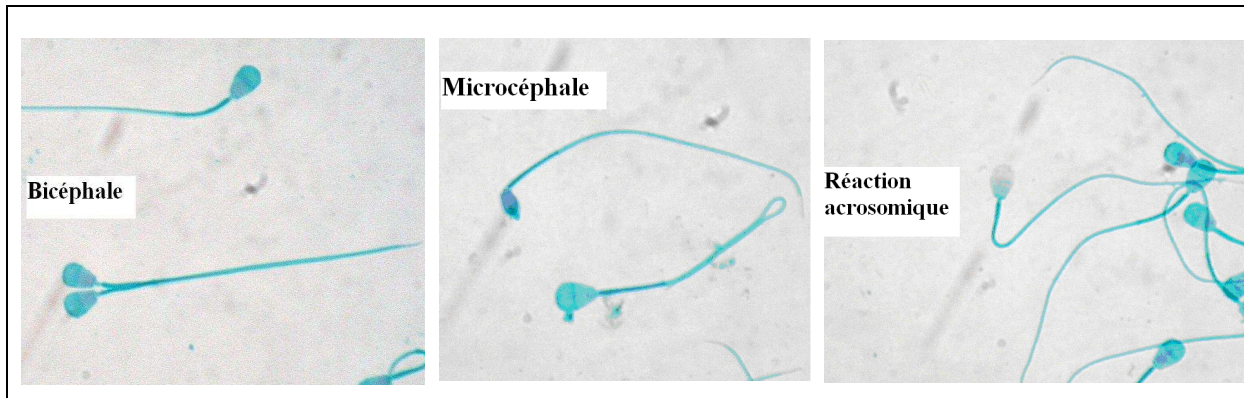
un spermatozoïde présente plusieurs anomalies, seule celle considérée comme majeure sera comptabilisée. Seules les têtes isolées sont comptabilisées, les queues isolées ne sont pas prises en compte.

Au CERCA, les anomalies prises en compte sont classées en six catégories, ainsi le pourcentage total de spermatozoïdes anormaux, les anomalies de la tête, de la pièce intermédiaire, du flagelle ainsi que le pourcentage de spermatozoïdes présentant des gouttelettes proximales et le pourcentage de décapités sont comptabilisés. Il faut cependant rester prudent pour l'interprétation du spermocytogramme car des formes anormales sont toujours présentes dans la semence d'animaux considérés comme fertiles c'est pourquoi il faut tenir compte de la proportion et de la nature de ces anomalies (Burke, 1986).

La coloration à l'éosine-nigrosine sert également à déterminer le pourcentage de spermatozoïdes « vivants ». La membrane des spermatozoïdes morts est perméable au colorant et le laisse pénétrer dans le compartiment intra-cellulaire, les spermatozoïdes morts sont donc colorés en rose alors que les vivants restent incolores. Ce colorant reste très utilisé en routine chez les espèces domestiques car son utilisation est simple et rapide mais un problème courant avec ce colorant est que l'hypoosmolarité de la solution peut entraîner la mort et la lyse des spermatozoïdes, ce qui représente une source d'artefacts (Peña Martinez, 2004).

D'autres colorants tels que la préparation commerciale Spermac®, également employée au CERCA, peuvent être utilisés. La figure 7 présente des spermatozoïdes après coloration au Spermac®.

Figure 5 : Exemples d'anomalies morphologiques sur des spermatozoïdes colorés au Spermac® : spermatozoïde bicéphale, microcéphale et spermatozoïde ayant effectué la réaction acrosomique (CERCA, 2007).



Bien que la coloration des lames soit plus longue avec ce colorant qu'avec l'éosine-nigrosine, ce produit reste intéressant car il colore la région post-acrosomique et nucléaire en rouge et l'acrosome, la pièce intermédiaire ainsi que la queue en vert. Cette coloration permet d'apprécier les anomalies morphologiques classiques mais aussi les spermatozoïdes ayant effectué la réaction acrosomique.

En dernier lieu, le nombre total de spermatozoïdes par éjaculat est multiplié par le pourcentage de spermatozoïdes morphologiquement normaux afin d'obtenir le nombre de spermatozoïdes morphologiquement normaux présents dans l'éjaculat considéré.

L'examen morphologique permet également de mettre en évidence la présence d'éléments en quantité anormalement élevée comme les leucocytes qui peuvent signer une infection du tractus génital ou encore des spermatocytes ou spermatides qui révèlent une anomalie fonctionnelle testiculaire. La présence de ces éléments doit conduire à une investigation approfondie du dysfonctionnement.

La Figure 6 représente la fiche établie lors de l'examen de la semence au CERCA et qui récapitule l'identité de l'animal, l'anamnèse, les paramètres séminologiques ainsi que les éventuels examens complémentaires effectués.

Figure 6 : Fiche utilisée au CERCA lors de l'examen de la semence

SPERMOGRAMME				N° CLOVIS : NOM : DATE : / /		
Intervenant(s) prélèvement :						
Présence d'une chienne en oestrus :						
Race :						
LIBIDO :						
SEMENCE : Aspect macroscopique :						
VOLUME	Phase 1 :	ml	Phase 2 :	ml	Phase 3 :	ml
Volume total si phases mélangées			ml			
Volume après centrifugation			ml	volume dilueur :		ml
MOBILITE	%		Nombre total de spermatozoïdes :			
ANOMALIES	Anormaux :	%	Têtes :	%	Pièces int :	%
	Gouttelettes :	%	Flagelles :	%	Décapités :	%
PMN <input type="checkbox"/>			Hématies <input type="checkbox"/>		Autres :	

Concentration :

Conclusion :

EXAMENS COMPLEMENTAIRES :

Oestradiol : P4 : PAL sur semence :
 Testostérone basale : T4 libre : RCCU :
 Post-stimulation : TSH :
 Brucellose : Herpesvirose : Bactériologie :
 Frottis prépuccial : Echographie génitale :

CONCLUSION :

Qu'il s'agisse d'un bilan de fertilité ou d'une collecte destinée à pratiquer une insémination artificielle, un spermogramme est effectué et les observations sont notées dans le tableau présenté ci-dessus. Lors d'exploration de l'infertilité, le clinicien peut être amené à prescrire

des examens complémentaires incluant des dosages hormonaux, des examens sérologiques, bactériologiques, frottis préputiaux ou encore échographies de l'appareil génital.

3.1.3 Examen après congélation

Après congélation, une paillette par éjaculat est examinée et le critère de décision adopté pour la conservation des paillettes est la mobilité fléchante. **Ne sont conservées que les semences présentant une mobilité fléchante supérieure à 50% (Fontbonne, 1993).**

3.1.4 Interprétation des examens (Tableau 15)

Le volume moyen pour un éjaculat chez le chien varie de 1 à 30 ml, mais le volume n'est pas corrélé à la qualité de la semence dans cette espèce (Johnston, 1991). **Un éjaculat doit contenir de 300 millions à 2 billions de spermatozoïdes**, sachant que les chiens de grandes races produisent plus de spermatozoïdes par éjaculat que ceux de petites races. **La dose fécondante minimale est estimée à 100 à 150 millions de spermatozoïdes morphologiquement normaux et mobiles (Fontbonne, 1993). Un éjaculat contenant au moins 70% de spermatozoïdes mobiles et au moins 70% de spermatozoïdes morphologiquement normaux est considéré de qualité satisfaisante.** Lorsque la proportion de spermatozoïdes morphologiquement normaux est en deçà de 60%, la fertilité est diminuée dans l'espèce canine (Oettlé, 1993). **Il convient cependant de rester prudent quant à l'interprétation du spermogramme comme du spermocytogramme, en effet, les résultats obtenus sur un seul éjaculat ne peuvent en aucun cas permettre de conclure sur la capacité reproductrice de l'étalon.** Les valeurs obtenues lors de l'analyse de la semence doivent être interprétées en regard de l'examen clinique et de l'anamnèse (Root, 2007). On doit considérer de multiples facteurs incluant le signalement de l'animal (race, âge...) et son statut de reproducteur (date de la dernière saillie ou collecte de sperme) voire même la période de l'année. Il ne faut donc pas conclure sur l'analyse d'un seul éjaculat mais considérer deux à trois analyses effectuées à deux ou trois semaines d'intervalle, afin d'avoir une estimation de la fonction sexuelle du chien. Cependant, la durée de la spermatogénèse étant de 55 à 70 jours, en cas de suspicion d'un problème de spermatogénèse, l'examen sera répété dix semaines plus tard.

Les méthodes classiques d'analyse de la semence pratiquées en routine se révèlent peu coûteuses et simples à mettre en œuvre, cependant elles nécessitent du temps et de la pratique. De plus, il est fortement conseillé de standardiser les procédures surtout si plusieurs personnes interviennent au sein d'une même structure (Seager et Platz, 1977).

Le Tableau 15 présente de façon synthétique les critères retenus pour la conservation d'un éjaculat de chien en vue de sa congélation.

Tableau 15 : Caractéristiques de l'éjaculat de qualité satisfaisante dans l'espèce canine pour l'utilisation en insémination artificielle (d'après Fontbonne, 1993).

Caractéristiques	Valeurs chiffrées
Nombre de spermatozoïdes par éjaculat	300.10 ⁶ à 2.10 ¹²
Dose fécondante minimale (Nombre de spermatozoïdes par dose)	100. 10 ⁶ à 150. 10 ⁶
% spermatozoïdes mobiles	Supérieur à 70%
% spermatozoïdes morphologiquement normaux	Supérieur à 70%

3.2 Evaluation de la qualité de la semence dans l'espèce bovine

3.2.1 Contexte et lieu d'étude

Pour décrire les méthodes d'évaluation de la semence dans l'espèce bovine, je me suis rendue dans un centre d'insémination, la COOPELSO (Coopérative Agricole d'Élevage du Sud-Ouest), située à Soual dans le Tarn (81). La COOPELSO est adhérente à MIDATEST, l'Union des Coopératives d'Élevage, d'Amélioration Génétique et d'Insémination Animale du Sud-Ouest de la France. Les missions de COOPELSO consistent en la diffusion du progrès génétique par la mise en place de la semence, la participation à la réalisation et au financement des programmes de sélection conduits par MIDATEST, la diffusion des nouvelles technologies de la reproduction (sexage d'embryons et transplantation embryonnaire) ainsi que la gestion d'une unité de production de semence pour le compte de MIDATEST.

Le chiffre d'affaires de la COOPELSO en 2005 élevait à 10 millions d'euros et 80% de cette somme venait de l'insémination artificielle. La COOPELSO regroupe 8200 adhérents et 68 inséminateurs. La COOPELSO dispose d'une taurrellerie de 162 taureaux (de races Prim'Holstein, Montbéliarde, Brune, Simmental, Blonde d'Aquitaine, Limousine, Charolaise et souche INRA 95) et produit 1,7 millions de doses par an.

En 2006, avec 160 735 Inséminations Artificielles réalisées dont 55% avec de la semence de taureau allaitant, la COOPELSO était la première coopérative d'Insémination Artificielle (IA) française pour l'activité IA allaitante et la sixième en ce qui concerne l'activité totale. 78 taureaux ont été collectés en 2005 et 2006 et ils ont produit 1 822 415 doses, dont 1 572 822 conservées pour 4070 collectes, soit une moyenne de 20 164 doses produites par taureau et par an. Le Tableau 16 présente l'évolution de la production de semence à la Coopelso de 1999 à 2006.

Tableau 16 : Evolution de la production de semence à la Coopelso de 1999-2000 à 2005-2006 (données Coopelso).

	1999-2000	2001-2002	2003-2004	2005-2006
Doses Congelées	1 641 382	1 661 508	1 733 059	1 572 822
Doses Fabriquées	1 759 907	1 815 343	1 894 247	1 822 415
Taureaux en production	102	114	85	78
Total Ejaculats produits	4713	4943	4 695	4070
% Ejaculats Eliminés	11.9	17.8	17.34	22.34
Nombre de doses fabriquées en moyenne par éjaculat	373	367	403	386

3.2.2 Examen de la semence

Les méthodes d'évaluation de la qualité de la semence utilisées en routine au laboratoire de la Coopelso sur les éjaculats de taureaux destinés à la congélation sont présentées ci-dessous. L'évaluation du sperme permet de décider si l'éjaculat peut être congelé ainsi que de la dilution adaptée à sa mise en paillette (qui dépend de la concentration initiale du sperme). Un

deuxième examen séminologique sera effectué après décongélation de la paillette afin d'estimer la résistance des spermatozoïdes à la congélation.

3.2.2.1 Organisation des locaux et matériel nécessaire

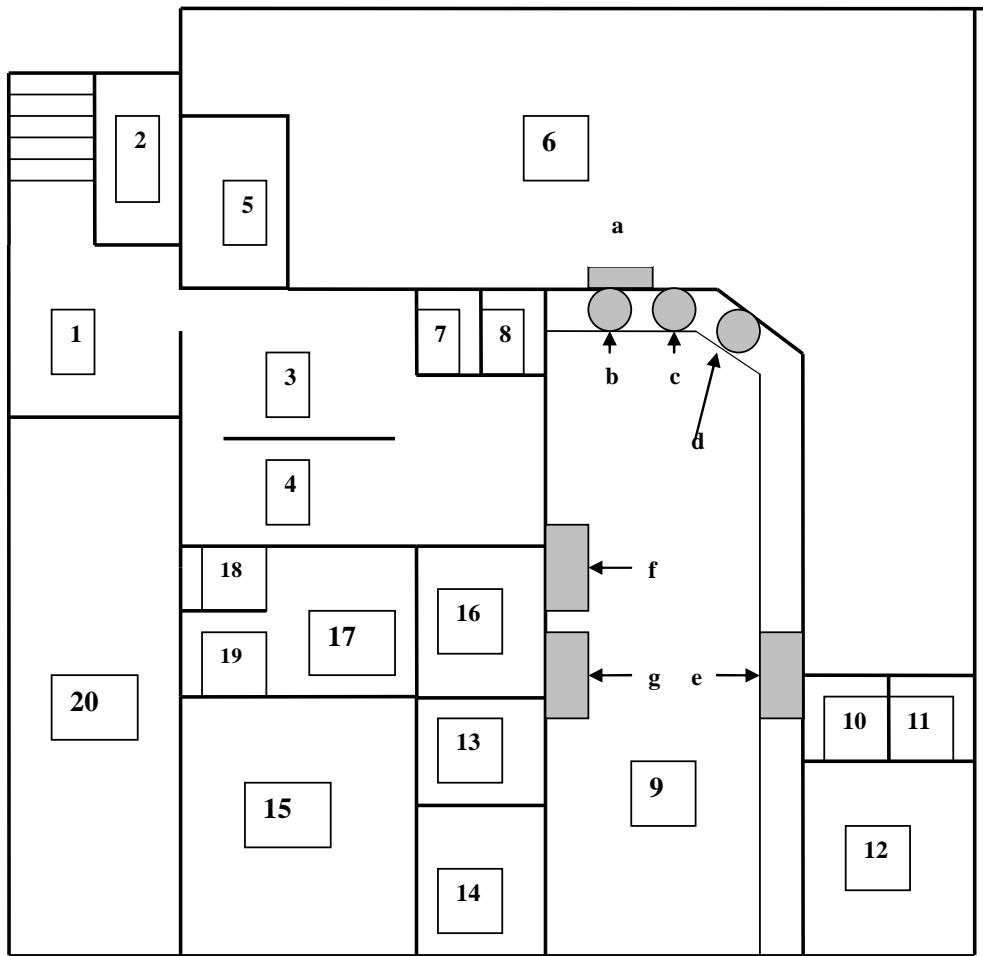
Dans le cadre d'une démarche qualité et pour garantir la qualité bactériologique de la semence, le laboratoire est organisé selon le principe de la marche en avant pour éviter tout croisement entre le matériel stérile et le matériel souillé.

Les postes de travail sont organisés ainsi :

- Sas de réception de la semence communiquant avec la salle de collecte
- Poste d'évaluation de la semence comprenant un microscope, un diluteur et un spectrophotomètre.
- Poste de dilution comprenant un bain-marie, de la verrerie stérile et une hotte à flux laminaire.
- Poste d'impression des paillettes.
- Armoire réfrigérée où s'effectue la deuxième dilution éventuelle de la semence et son conditionnement en paillettes.
- Poste de congélation.
- Salle de pré-stockage.
- Salle de stockage.
- Salle de distribution et quai d'embarquement des cuves de semence.

La Figure 7 présente un plan des laboratoires de la Coopelso. Ce plan permet de visualiser l'application du principe de « marche en avant ».

Figure 7 : Plan des locaux du laboratoire Coopelso.



- 1 : Hall d'entrée
- 2 : Toilettes
- 3 : Vestiaires hommes
- 4 : Vestiaires femmes
- 5 : Cabine visiteurs
- 6 : Salle de monte
- 7 : Toilettes femmes
- 8 : Toilettes hommes
- 9 : Laboratoire (45 m²)
- 10 : Salle stockage vagins artificiels sales (2,2 m²)
- 11 : Salle stockage vagins artificiels propres (2,2 m²)
- 12 : Laverie (8 m²)
- 13 : Salle de pré-stockage (5m²)
- 14 : Bureau (6m²)
- 15 : Salle de stockage (28 m²)
- 16 : Magasin (6,6 m²)
- 17 : Salle de préparation
- 18 : Sas de réception

- a. Sas de communication entre la salle de monte et le laboratoire
- b. poste d'examination (microscope)
- c. poste de détermination de la concentration (spectrophotomètre)
- d. poste de dilution
- e. poste d'équilibration de la température (réfrigérateur)
- f. poste d'impression des paillettes et de conditionnement en paillettes
- g. poste de congélation

Après collecte et avant toute analyse, la semence est identifiée. Le tube est immédiatement bouché pour éviter toute contamination. De plus en plus souvent, les taureaux sont équipés de puces électroniques individuelles dont la lecture au moment de la collecte permet la traçabilité de l'éjaculat jusqu'à la mise en paillette. Au laboratoire de la COOPELSO, l'opérateur examine 20 à 25 éjaculats par jour et l'examen de contrôle du sperme dure 2 à 3 minutes pour l'échantillon frais, avant congélation et 2 à 3 minutes pour l'examen de la semence après décongélation.

3.2.2.2 Analyse macroscopique

Immédiatement après la récolte, on procède à un examen visuel du sperme dans le tube de récolte qui permet d'apprécier le volume, la couleur et la consistance de l'éjaculat.

a) Volume

Le volume de semence recueilli par vagin artificiel varie en fonction de l'âge, de la race, de la préparation du taureau, de l'alimentation et pour un même taureau, des facteurs psychiques et environnementaux. **Le volume varie entre les valeurs extrêmes de 0,5 à 14 ml avec une moyenne de 4 ml (Parez et Duplan, 1987).** Le volume est mesuré le plus souvent par lecture directe du tube de collecte.

b) Couleur

La couleur classique du sperme est blanchâtre bien que certains taureaux aient une semence de couleur jaunâtre liée à la teneur en carotène de la ration. Cependant une coloration jaunâtre peut également être anormale dans la mesure où elle peut être révélatrice de la présence de pus ou d'urine dans le sperme. Une coloration rosée évoque la présence de sang en nature dans l'échantillon et peut signer une lésion urétrale ou de la verge. Une coloration brunâtre est le signe d'une affection du tractus génital engendrant une hémorragie. La coloration grisâtre peut être due à une contamination par du pus. **Tout échantillon avec une coloration anormale sera éliminé et une exploration devra être envisagée afin de caractériser l'origine de cette anomalie.**

c) Viscosité

La viscosité est corrélée à la concentration en spermatozoïdes, en effet l'éjaculat est d'autant plus visqueux que le nombre de spermatozoïdes est élevé. **Le sperme a généralement une consistance « laiteuse » à « crémeuse »**. La présence de grumeaux dans l'échantillon ou la formation d'un filament glaireux à l'extrémité de la pipette signe une pathologie (Parez et Duplan, 1987). On peut également évaluer l'opacité du sperme qui est liée la concentration en spermatozoïdes de l'éjaculat (Tableau 17).

Tableau 17 : Classement du sperme en fonction de l'examen macroscopique : Recommandations de la société de Theriogenology (Elmore, 1985).

Couleur	Turbidité	Consistance et viscosité	Concentration prévue en spermatozoïdes par ml	Qualité attribuée au sperme
Blanc	Opaque	Crémeuse et visqueuse	750 millions à 2 milliards	Très bonne
Blanc	Opaque	Faiblement visqueuse	400 à 750 millions	Bonne
Blanc sale	Légèrement translucide	Laitieuse	250 à 400 millions	Assez bonne à moyenne
Grisâtre	Translucide	Aqueuse	Inférieure à 200 millions	Mauvaise

3.2.2.3 Examens microscopiques

a) Motilité massale

La motilité massale est évaluée immédiatement après la collecte du sperme. L'éjaculat est maintenu à une température de 37°C et l'examen est réalisé sur une platine chauffée à 37°C. Le matériel en contact avec le sperme et la platine du microscope sont également conservés à 37°C pour éviter tout choc thermique. La motilité massale est estimée au microscope à contraste de phase au grossissement x100 : une microgoutte de sperme est déposée sur une lame et le mouvement global des spermatozoïdes est apprécié en fonction de l'intensité des vagues observables. Une note de 0 (aucun mouvement de vague décelable) à 5 (tourbillons

rapides) est attribuée à l'échantillon observé; il est possible de convertir cette note en un pourcentage approximatif de spermatozoïdes mobiles (la note 3 correspondant approximativement à 70% de spermatozoïdes mobiles). Lors de cet examen, on ne note pas la motilité individuelle des spermatozoïdes mais les turbulences engendrées par la conjugaison des mouvements issus de tous les spermatozoïdes présents dans la goutte de semence observée. La classification classiquement adoptée dans les laboratoires d'examen de la semence, est détaillée dans le Tableau 18.

Tableau 18 : Critères de notation de la motilité massale de la semence dans l'espèce bovine.

	Nature et intensité du mouvement
0	Aucun mouvement à la surface de la goutte
1	Léger mouvement à la surface de la goutte
2	Mouvement net mais ne formant pas de vague
3	Début de vagues
4	Vagues très nettes
5	Tourbillons nettement visibles

Ce test est employé sur tous les éjaculats potentiellement congelables, car il s'agit d'un examen rapide, facile à mettre en œuvre et peu coûteux, cependant il reste subjectif et dépend largement de l'expérience de l'opérateur. L'opérateur expérimenté attribue une note en observant la goutte de sperme durant dix à quinze secondes. **Les éjaculats de qualité satisfaisante présentent une note supérieure ou égale à 3.**

b) Motilité individuelle

L'évaluation de la motilité individuelle des spermatozoïdes est complémentaire de la note de motilité massale. Cet examen vise à évaluer le pourcentage de spermatozoïdes motiles, c'est-à-dire ayant une mobilité propre et non pas se mouvant de façon passive (Dumont, 1997). Pour cet examen, le sperme est dilué 10 à 40 fois dans un tampon isotonique tiède et on observe à fort grossissement (x 200) une goutte de cette solution placée entre lame et lamelle, en éclairage contrasté (ou mieux encore, au microscope à contraste de phase). On note le

pourcentage de spermatozoïdes dotés d'une motilité dite « fléchante », c'est-à-dire les spermatozoïdes présentant une trajectoire quasi rectiligne et capables de traverser le champ en 2 à 3 secondes. Certains spermatozoïdes présentent des mouvements rotatoires circulaires ou des mouvements d'amplitude très réduite, ils ne sont donc pas comptabilisés dans les spermatozoïdes mobiles.

Au laboratoire de Soual, cet examen n'est pas réalisé en routine mais seulement dans quelques cas pour lesquels la motilité massale est mauvaise. Il s'agit encore une fois d'un examen subjectif qui requiert une certaine expérience, cependant, un opérateur bien formé donne des résultats relativement répétables (Parez et Duplan, 1987).

Il existe maintenant des analyseurs automatisés de la mobilité des spermatozoïdes associés à des logiciels d'analyse d'image. Ces appareils ne sont toutefois utilisés actuellement que dans 3 des centres habilités à la collecte et à la préparation de la semence bovine compte tenu de leur coût élevé.

c) Concentration en spermatozoïdes

La concentration en spermatozoïdes de l'éjaculat permet de déterminer le taux de dilution adapté pour la réalisation de paillettes de semence congelée utilisées pour l'insémination artificielle. Le volume de dilueur est calculé en fonction du nombre total de spermatozoïdes présents dans l'éjaculat, du nombre de spermatozoïdes souhaités dans chaque dose et du volume utile de la paillette.

Dans les Coopératives d'Élevage et d'Insémination Animale, on a le plus souvent recours à des méthodes indirectes d'estimation de la concentration, comme la néphélométrie (Dumont, 1997). On mesure l'absorption d'un flux lumineux à travers le sperme dilué à l'aide d'un spectrophotomètre à la longueur d'onde de 535 nm. En pratique, un échantillon de 20 ou de 40 microlitres de sperme est dilué dans du sérum physiologique pour obtenir un volume final de 1ml dans la cuvette du spectrophotomètre. Le rapport de la densité optique finale sur la densité optique émise est corrélé à la concentration en spermatozoïdes de l'échantillon considéré. Le spectrophotomètre est recalibré régulièrement (une fois par an au minimum) à partir de comptages de référence effectués à la cellule hématimétrique afin de tenir compte d'éventuelles dérives liées au dilueur ou à l'appareil lui-même.

Pour les taureaux dont le plasma séminal est naturellement coloré ou pour ceux dont la semence contient des cellules non germinales, la concentration peut être surestimée. Cependant, en routine pour l'évaluation de l'éjaculat, l'estimation peut souffrir d'une certaine approximation. **Cette méthode demeure donc fiable et d'une précision satisfaisante dans la pratique courante, elle représente en outre un gain de temps précieux par rapport au comptage à la cellule hématimétrique.**

d) Pourcentage de spermatozoïdes vivants

Le pourcentage de spermatozoïdes vivants est apprécié de façon approximative, au microscope optique, cette valeur est fortement corrélée à la qualité du mouvement. Cette estimation est subjective et dépend fortement de l'expérience de l'opérateur. L'examen s'effectue de manière plus aisée sur frottis coloré à l'éosine-nigrosine, en effet, les spermatozoïdes dont la membrane est endommagée laissent pénétrer le colorant et apparaissent donc roses (éosine) sur fond bleu (nigrosine) alors que les spermatozoïdes vivants ont une membrane intacte et apparaissent donc incolores. Pour effectuer cette coloration, une goutte de sperme puis deux gouttes d'une solution d'éosine-nigrosine sont déposées sur une lame de microscope, puis mélangées délicatement au moyen d'un mélangeur en verre rodé. Ensuite, l'étalement est effectué, puis le frottis est séché par agitation. Si le taux de spermatozoïdes vivants est inférieur à 60%, la semence n'est pas conservée.

Cet examen n'est pas réalisé en routine car le critère de qualité le plus pertinent pour l'utilisation en IA bovine est le pourcentage de spermatozoïdes vivants après décongélation.

e) Morphologie des spermatozoïdes

Le laboratoire de la COOPELSO, ne réalise pas d'examen morphologique des spermatozoïdes en routine. Cependant, ces examens peuvent être réalisés sur des taureaux considérés comme « douteux » afin d'aider l'opérateur dans sa prise de décision de rejet ou de conservation de la semence. L'examen de la morphologie est effectué sur les jeunes taureaux, avant la phase de testage pour évaluer la fonction sexuelle du futur taureau reproducteur. Ensuite, pour les taureaux sélectionnés dans la filière de l'insémination artificielle, le Laboratoire National de Contrôle des reproducteurs procède à au moins un examen morphologique de la semence par an. Ce laboratoire agréé par le ministère de l'agriculture et situé à Maisons-Alfort, est chargé

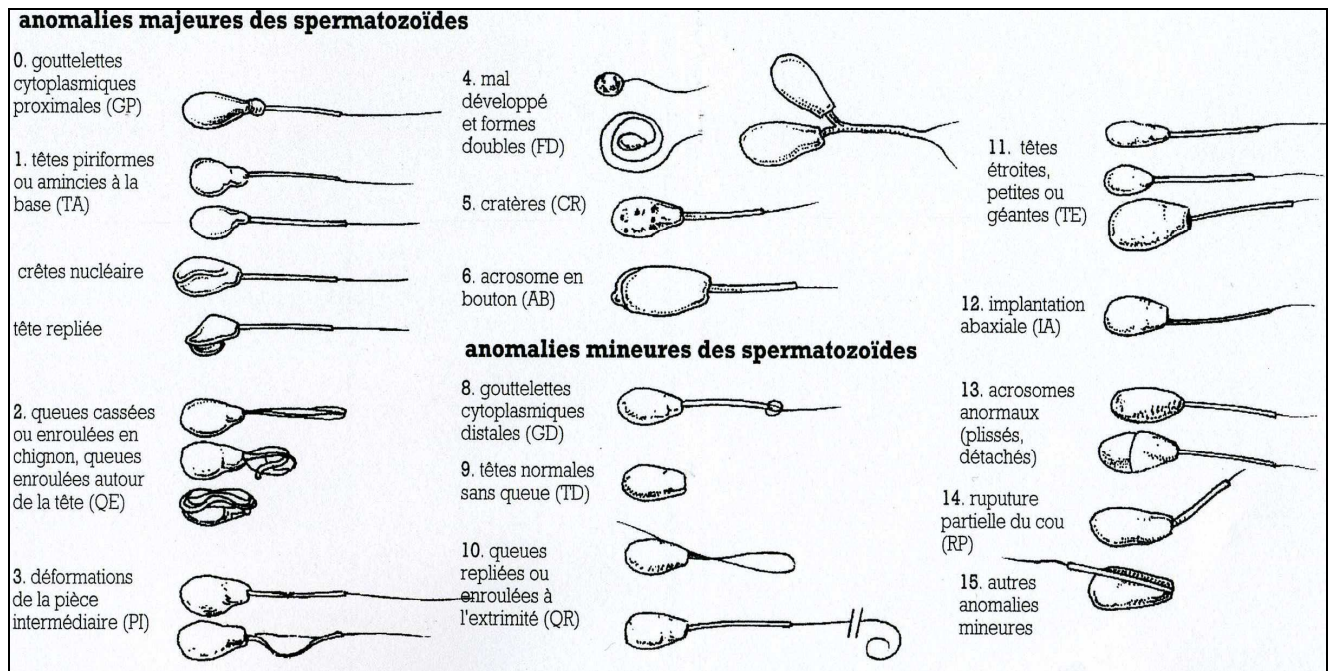
depuis 1952 de garantir aux éleveurs la qualité sanitaire de la semence dans la filière de l'insémination artificielle en France mais son laboratoire d'andrologie est également le laboratoire de référence pour l'examen de la semence.

En pratique, l'examen morphologique des spermatozoïdes, consiste en l'observation au microscope optique d'un étalement de semence coloré à l'éosine-nigrosine (le plus souvent) ou au Giemsa, à l'encre de Chine ou au rose Bengale. Le frottis est coloré de la même manière que pour l'examen de la vitalité (*vide supra*). Sous microscope à contraste de phase ou sous immersion (grossissement x 400 à 600), les anomalies sont comptées sur au moins 200 spermatozoïdes.

On distingue trois types de classifications de la morphologie des spermatozoïdes. La première dépend du site de dysfonctionnement et sépare les anomalies en anomalies primaires et secondaires. La désignation d'anomalie primaire est réservée à des anomalies se produisant lors de la spermatogénèse (à l'intérieur des tubes séminifères) contrairement aux anomalies dites secondaires qui surviennent après la spermatogénèse durant la maturation épидидymaire voire lors de l'éjaculation. Cette classification est toutefois contestable car certaines anomalies comme les gouttelettes proximales classées initialement en anomalies secondaires résultent finalement d'une malformation de la cellule lors de la spermatogénèse et non pas d'un dysfonctionnement épидидymaire comme cela était évoqué auparavant (Morrow, 1986).

La seconde classification est fonction de la répercussion des anomalies des spermatozoïdes sur la fertilité des taureaux. Elle a été proposée par Blom en 1973 et distingue les anomalies mineures des anomalies majeures (Figure 8). Cependant les données actuelles sur la relation entre ces anomalies morphologiques et la fertilité sont limitées, c'est pourquoi cette classification, bien qu'universellement reconnue et utilisée, reste contestable.

Figure 8 : Anomalies majeures et mineures de spermatozoïdes dans l'espèce bovine (Dumont, 1997)



Enfin le troisième type de classification est basé sur la localisation de l'anomalie sur le spermatozoïde (anomalie de tête, de pièce intermédiaire, de flagelle). C'est la classification adoptée par le Laboratoire National de Contrôle des Reproducteurs (Figure 9).

Figure 9 : Paramètres contrôlés par le Laboratoire National de Contrôle des Reproducteurs (Maisons-Alfort).

<p>LABORATOIRE NATIONAL DE CONTRÔLE DES REPRODUCTEURS (ACSEDIATE) 13, rue Jouët - B.P. 65 94703 MAISONS-ALFORT CEDEX Téléphone: 01 43 53 51 00 Télécopie: 01 43 53 51 01</p>		<p>C.I.A. CODELIA 43 HAUTE-LOIRE</p>	
<p>Demandeur : MIDATEST Service Zootechnique Les Nauzes</p>		<p>43700 COUBON</p>	
<p>81580 SOUAL</p>			
Maisons-Alfort, le 26 Avril 2001			
Prélèvement(s) reçu(s) le 13 Avril 2001		Prélèvement(s) effectué(s) le 11 Avril 2001	
Enregistrement:		Motif de l'examen: Contrôle Règlementaire Annuel	
Nature du prélèvement: Sang+Sperme+L. Préputial+Fèces			
Taureau -			
N° I.E.:	N° Station:	Date de Naissance: 11/12/1998	Race: Charolaise
ANDROLOGIE - SÉMINOLOGIE			
Volume (ml)		: 2	
Motilité initiale (% de spermatozoïdes mobiles)		: 75	
Motilité initiale (note de 0 à 5)		: 3	
Concentration en spermatozoïdes (milliards/ml)		: 1.04	
Spermatozoïdes anormaux (%)		: 18.0	
Anomalies de tête (%) (Frottis)		: 0.0	
Anomalies de pièce intermédiaire (%) (Frottis)		: 6.0	
Anomalies de queue (%) (Frottis)		: 12.0	
Têtes détachées (%) (Frottis)		: 0.0	
Cellules étrangères (Frottis)		: Absence de cellule	
Test de Schalm (Leucocytost)		: Négatif	
Examen clinique de l'appareil génital		: Appareil génital externe normal	
Observations sur l'examen sanitaire du sperme		: Examen normal	
Conclusion du spermogramme		: Favorable	

L'observation d'un frottis au microscope optique est peu coûteuse et simple à réaliser mais elle requiert une formation de qualité de l'opérateur, une pratique régulière et beaucoup de temps. En outre, de nombreux artefacts peuvent apparaître lors de l'étalement et la qualité de l'observation est très variable, cela peut engendrer des sous-estimations du nombre d'anomalies car elles ne sont pas toutes identifiables en microscopie optique. L'emploi du microscope à contraste de phase peut permettre d'éviter les artefacts. **En insémination artificielle, le sperme destiné à la congélation doit contenir moins de 20 à 25% de spermatozoïdes anormaux et plus de 60% de spermatozoïdes vivants.**

f) Test d'aptitude à la congélation

Les changements de température imposés lors de la congélation et de la décongélation endommagent les membranes cytoplasmiques, le cytosquelette, les organites impliqués dans la mobilité ainsi que l'acrosome. Les capacités fonctionnelles du spermatozoïde sont donc altérées. C'est pourquoi il est important, dans le cadre de l'insémination artificielle, d'évaluer la qualité de la semence après congélation. Ainsi, pour chaque éjaculat conservé à -196°C dans l'azote liquide, la motilité massale (et/ou individuelle) est évaluée après décongélation de deux à trois paillettes de même que le pourcentage de spermatozoïdes morts et vivants, avec les mêmes méthodes que celles employées pour l'examen de la semence fraîche. D'une façon générale, la corrélation entre l'aptitude à la congélation et la qualité du sperme frais est relativement élevée (Dumont, 1997). Cependant, il arrive parfois qu'une semence jugée de bonne qualité, en frais, (note attribuée en motilité massale supérieure à 3 et plus de 60% de spermatozoïdes vivants) s'avère particulièrement mauvaise après décongélation. C'est pourquoi ce test est indispensable pour tout taureau dont le sperme est destiné à l'insémination artificielle en semence congelée.

Les critères retenus pour la conservation des paillettes sont basés sur la quantité de spermatozoïdes fléchants. **Pour qu'un éjaculat soit conservé, il doit présenter plus de 25% de spermatozoïdes fléchants et plus de 8 millions de spermatozoïdes fléchants par paillette, après décongélation.**

3.2.3 Interprétation des examens réalisés (Tableau 19).

Pour les taureaux utilisés en insémination artificielle, la motilité doit être supérieure à 60%, soit une note supérieure à 3 attribuée en motilité massale. La concentration de l'éjaculat doit être supérieure à 0,5 milliard par ml. Le seuil d'anomalies morphologiques se situe à moins de 30% de spermatozoïdes anormaux, moins de 20% d'anomalies majeures et moins de 10% pour chaque rubrique d'anomalies majeures (Dumont, 1997). Toutefois, ces critères sont moins sévères pour les taureaux utilisés en monte naturelle dans la mesure où l'éjaculat ne sera pas fractionné, dilué ou congelé. Les critères de décision pour la conservation de l'éjaculat sont résumés dans le Tableau 19.

Tableau 19 : Critères de décision pour la conservation de l'éjaculat (d'après Dumont, 1997).

Critères	Seuil pour l'utilisation en Insémination Artificielle	Seuil pour l'utilisation en monte naturelle
Aspect macroscopique	Aspect « crémeux » à « laiteux »	Aspect « crémeux » à « laiteux »
Volume	0,5 à 14 ml	1 à 10 ml
Motilité massale	Note ≥ 3	Note ≥ 2
Motilité individuelle	$\geq 60\%$	$\geq 30\%$
Pourcentage de spermatozoïdes anormaux totaux	$\leq 30\%$	$\leq 40\%$
Pourcentage de spermatozoïdes ayant des anomalies majeures	$\leq 20\%$	$\leq 30\%$
Pourcentage de spermatozoïdes dans chaque rubrique d'anomalies majeures	$\leq 10\%$	$\leq 20\%$
Concentration	$\geq 0,5 \cdot 10^9$ spermatozoïdes/ ml	$\geq 0,3 \cdot 10^9$ spermatozoïdes/ ml

3.3 Evaluation de la qualité de la semence chez l'homme

3.3.1 Contexte et lieu d'étude

Afin de décrire les méthodes couramment employées pour l'analyse du sperme humain, je me suis rendue dans le laboratoire d'andrologie du Centre d'Etude et de Conservation des Œufs et du Sperme humain (CECOS), ainsi que dans le laboratoire du centre d'infertilité et de Procréation Médicalement Assistée du Centre Hospitalier Universitaire de Toulouse - Purpan, à l'Hôpital Paule de Viguier.

Le laboratoire du CECOS de Toulouse procède à des examens de sperme en vue de l'exploration de la fertilité masculine et effectue des tests de compatibilité sperme-glaire. Il effectue également la préparation et la congélation de sperme en vue d'inséminations intra-conjugales et d'inséminations avec sperme de donneur mais aussi la préparation de sperme en

vue d'insémination, FIV ou ICSI chez l'homme infecté par le VIH et chez l'homme blessé au niveau de la moelle spinale. Le CECOS a également pour missions le recrutement de donneurs de sperme ainsi que la conservation et la gestion du don de sperme et d'ovocytes. Le CECOS prend en charge les consultations de couple en vue de procréation médicalement assistée hétérologue et les consultations avant auto-conservation de sperme précédant un traitement à risque pour la fertilité (chimiothérapie, radiothérapie et autres traitements) ainsi que les consultations de suivi post traitement anti-néoplasique ou autre. Toutes ces activités se font en collaboration avec les autres secteurs du groupe d'activité de médecine de la reproduction et en relation avec les cancérologues pour les problèmes de préservation de la fertilité. L'équipe du CECOS de Toulouse est par ailleurs l'une des équipes françaises ayant une activité de recherche active sur l'infertilité, notamment masculine, au sein de l'équipe de recherche « Equipe d'Accueil 3694 : Fertilité humaine » qui implique de nombreuses personnes du groupe d'activité de la médecine de la reproduction.

Le laboratoire du centre d'infertilité et de Procréation Médicalement assistée procède quant à lui, à l'examen de la semence avant de pratiquer la Fécondation In Vitro ou l'ICSI (Intra-Cytoplasmic Sperm Injection) et met en œuvre toutes les procédures de procréation médicalement assistée.

3.3.2 Méthodes d'évaluation de la qualité de la semence

La standardisation des conditions de prélèvement de sperme est importante pour l'interprétation de l'examen du sperme. Le sperme analysé doit être obtenu par masturbation, après un délai d'abstinence de 3 à 5 jours et doit être recueilli de préférence dans une pièce à proximité du laboratoire. Si le sperme est destiné à une spermoculture, il faudra prévoir un nettoyage antiseptique des mains et du pénis du patient ainsi qu'un matériel stérile pour sa récolte et sa manipulation.

Le spermogramme a pour but d'évaluer l'activité sécrétoire des différents compartiments participant à l'éjaculation : le volume, la viscosité et le pH de l'éjaculat ainsi que la numération, la mobilité, la vitalité et la morphologie des spermatozoïdes. Les examens prescrits par le médecin peuvent inclure un spermogramme et un spermocytogramme (analyse morphologique détaillée des spermatozoïdes) mais aussi une culture bactériologique si une

infection est suspectée ou une analyse biochimique des marqueurs du plasma séminal, qui peut permettre de localiser un dysfonctionnement dans la synthèse du liquide spermatique (vésicules séminales, prostate...). Quelle que soit la nature des examens et l'indication, l'interprétation du spermogramme doit toujours être corrélée à l'examen clinique.

3.3.2.1 Examen macroscopique

Le sperme normal se liquéfie en une heure environ à température ambiante. Si le sperme ne se liquéfie pas, un traitement additionnel peut être nécessaire pour permettre l'analyse de l'éjaculat.

a) Aspect

L'éjaculat est observé à température ambiante, juste après liquéfaction. **Un sperme normal présente un aspect homogène, gris opalescent. Selon sa concentration, le sperme peut être plus ou moins opaque.** Toute coloration rosée ou brunâtre peut traduire la présence d'hématies.

b) Volume

Le volume traduit essentiellement les capacités sécrétoires des glandes annexes. Le volume de l'éjaculat est noté de façon précise au moyen d'une pipette calibrée, la mesure est faite à 0,1 ml près. **Le volume moyen est de 2ml.** L'hyperspermie (volume supérieur à 6ml) n'est pas pathologique mais résulte souvent d'une hypersécrétion des vésicules séminales. L'hypospermie (volume inférieur à 2 ml) résulte d'un trouble de l'éjaculation ou bien d'une hyposécrétion des glandes annexes pouvant être la conséquence d'une infection ou d'une absence de ces glandes (Grizard et Jimenez, 1997)

c) Viscosité

La viscosité ou consistance, est généralement évaluée par aspiration douce au moyen d'une pipette de 5 ml, en notant la façon dont le sperme s'écoule par simple gravité à l'extrémité de la pipette. Si le sperme a une consistance normale, il s'écoule de la pipette en formant des gouttes séparées les unes des autres. Si la viscosité est augmentée, entre chaque goutte, il se forme des filaments de plus de 2cm. **On attribue une note d'une croix à trois croix. Un**

sperme de viscosité normale est noté de (+) à (++). L'hyperviscosité signe en général un dysfonctionnement de la prostate et des vésicules séminales.

d) pH de l'éjaculat

Une goutte de sperme est déposée sur du papier pH et le pH est déterminé au moyen de l'échelle colorée. Il est important de procéder à cette mesure toujours au même moment et dans l'heure suivant l'éjaculation. **Le pH se situe généralement entre 7,2 et 8**. Des valeurs trop faibles peuvent être le reflet d'un défaut de sécrétion des vésicules séminales (normalement alcalines) alors qu'un pH nettement alcalin peut révéler une insuffisance des sécrétions prostatiques (normalement légèrement acides).

3.3.2.2 Examen microscopique

Pour l'examen microscopique des préparations non colorées, il est préférable d'utiliser un microscope à contraste de phase mais un microscope optique peut suffire en veillant à abaisser le condenseur pour disperser la lumière. Pour ces examens, le matériel doit idéalement être chauffé à 37°C (platine chauffante).

a) Mobilité

La mobilité est évaluée dans l'heure qui suit la collecte (après liquéfaction) et quatre heures après éjaculation. La mobilité individuelle est estimée en plaçant, au moyen d'une micropipette, une microgoutte de sperme calibrée à 10 µl sur une lame de verre. Une lamelle de verre est ensuite déposée sur la goutte de sperme. La lame est examinée rapidement au grossissement x 100 puis observée au grossissement x 400, sur une dizaine de champs répartis sur la lame. Si la préparation n'est pas homogène, l'examen doit être répété. Si le nombre de spermatozoïdes est très faible, il faut centrifuger puis éliminer le plasma séminal surnageant ; la concentration sera ensuite déterminée en tenant compte du volume de plasma séminal éliminé (Auger et Jouannet, 1993).

Le mouvement des spermatozoïdes observés est classé dans les catégories suivantes (Auger et Jouannet, 1993) :

- Rapide et progressif : a ;
- Lent et progressif : b ;

- Mobile mais non progressif : c ;
- Immobile : d.

Le nombre de spermatozoïdes de chaque catégorie peut-être compté à l'aide d'un compteur manuel. Au moins 100 spermatozoïdes sont comptés et les pourcentages sont évalués pour chaque catégorie. Lors de cet examen visuel, on évalue également la présence d'agglutinats de spermatozoïdes qui peuvent révéler l'existence d'anticorps anti-spermatozoïdes.

b) Vitalité des spermatozoïdes

Une coloration à l'éosine-nigrosine est utilisée pour évaluer le pourcentage de spermatozoïdes vivants, une heure après récolte du sperme. 10 µl de sperme et 20 µl d'éosine sont mélangés avec précaution. Après 30 secondes, 30 µl de nigrosine sont ajoutés et le tout est à nouveau mélangé. 10 µl de ce mélange sont étalés sur lame de verre, le séchage se fait à l'air libre et l'observation est réalisée au microscope, grossissement x1000, à immersion. Les spermatozoïdes morts sont colorés en rose. On compte le nombre de spermatozoïdes morts et vivants sur un total d'au moins 100 spermatozoïdes.

c) Concentration

La concentration en spermatozoïdes est évaluée en utilisant un hémocytomètre. Le sperme est dilué au $1/20^{\text{ième}}$ en ajoutant à 50 µl de sperme 950 µl du milieu de dilution (5g de bicarbonate de sodium, 1 ml de formol et eau distillée QSP 100ml). Si le sperme est très peu concentré, on diluera seulement au $1/2$ ou $1/10^{\text{ième}}$. Ce mélange provoque la mort des spermatozoïdes et leur immobilisation, ce qui facilite leur comptage. Le mélange est introduit par capillarité dans les compartiments de la cellule de Malassez et laissé dix minutes dans une chambre humide pour permettre la sédimentation des cellules. Le comptage s'effectue au microscope à contraste de phase au grossissement x 200 ou x 400. Les spermatozoïdes sont comptés mais les flagelles isolés ne sont pas pris en considération. Seules les cellules rondes (c'est-à-dire les cellules de la lignée germinale ainsi que les leucocytes et les cellules épithéliales) dont la surface est au moins égale au double de la surface de la tête d'un spermatozoïde sont prises en compte.

Le nombre de carreaux comptés est fonction de la concentration en spermatozoïdes. Pour la concentration, la semence est classée selon la nomenclature décrite dans le Tableau 20.

Tableau 20 : Nomenclature en fonction de la concentration du sperme humain (d'après Andrade-Rocha, 2003).

	Concentration de l'éjaculat
Polyzoospermie	Supérieur à 250×10^6 / ml
Normozoospermie	Entre 20 et 250×10^6 / ml
Oligozoospermie légère	Entre 10 et 20×10^6 / ml
Oligozoospermie modérée	Entre 5 et 10×10^6 / ml
Oligozoospermie sévère	Inférieur à 5×10^6 / ml
Azoospermie	Absence de spermatozoïde dans l'éjaculat

d) Morphologie des spermatozoïdes

L'appréciation des caractères morphologiques des spermatozoïdes est complexe du fait de la grande variabilité de la morphologie des spermatozoïdes humains. Pendant longtemps, l'intérêt de l'examen morphologique des spermatozoïdes n'a pas été clairement démontré, d'autant plus qu'en l'absence de toute standardisation, la dénomination des anomalies variait d'un laboratoire à l'autre et par conséquent toute comparaison entre laboratoires s'avérait impossible (David, *et al.*, 1975). Il est maintenant établi que le pourcentage de spermatozoïdes normaux et de certaines anomalies spécifiques des spermatozoïdes ont une bonne valeur pronostique *in vivo* et *in vitro* (Auger et Eustache, 2000).

Bien que le manuel de l'OMS propose différentes colorations des spermatozoïdes (Giemsa, Bryan-Leishman ou Shorr), la plupart des laboratoires d'andrologie (dont le CECOS de Toulouse) utilisent la coloration de Papanicolaou modifiée. Cette dernière colore la tête du spermatozoïde en bleu pâle dans la région acrosomique et en bleu foncé dans la région post-acrosomique. La pièce intermédiaire est rouge pâle et le flagelle est coloré en bleu. Les éventuels restes cytoplasmiques qui sont situés derrière la tête sont, en général, colorés en vert.

L'étalement de sperme sur une lame de verre est placé successivement dans les différents bains puis les lames sont montées à l'Eukitt (liquide de montage synthétique à séchage rapide). La lame est observée au microscope optique au grossissement $\times 1000$ à l'immersion.

L'un des oculaires est muni d'un réticule gradué qui permet de disposer d'un critère de taille. La lecture se pratique en queue de frottis avec un balayage systématique « en méandre » de la lame. Certains spermatozoïdes se présentent de profil sur l'étalement, on observe alors une image caractéristique « en flamme de bougie ». Ces spermatozoïdes ne doivent pas être pris en compte pour l'examen morphologique car sur ces formes, on ne peut pas distinguer d'acrosome (ce qui permet de les distinguer des spermatozoïdes à tête amincie).

Compte tenu de l'hétérogénéité morphologique des spermatozoïdes humains, il faut observer au minimum 100 spermatozoïdes pour un examen morphologique, les observations sont ensuite converties en pourcentage. Cependant, si le sperme est peu concentré, l'examen est réalisé sur un maximum de spermatozoïdes. Dans ce cas, le chiffre ne sera pas converti en pourcentage et le nombre total de spermatozoïdes comptés sera précisé (car le faible nombre de spermatozoïdes comptés diminue la précision de l'examen).

La classification des anomalies utilisée au laboratoire de spermiologie du CECOS est la classification de David modifiée (David *et al.*, 1975 ; Auger et Eustache, 2000), alors que le Laboratoire de Procréation Médicalement Assistée utilise la classification de Kruger (Kruger *et al.*, 1987).

La classification de David a été proposée en 1972 et publiée en 1975, suite au constat d'une hétérogénéité flagrante entre laboratoires d'andrologie quant à l'interprétation des anomalies morphologiques des spermatozoïdes. Cette classification est originale car elle permet de répertorier toutes les anomalies sur un même spermatozoïde alors qu'auparavant on ne prenait en compte qu'une seule anomalie. De plus cette classification décrit treize classes d'anomalies et un recueil de microphotographies de spermatozoïdes normaux et anormaux y est associé, permettant de classer le plus objectivement possible les anomalies observées (David *et al.*, 1975). La classification de David a été largement adoptée par les laboratoires de spermiologie dans les années soixante-dix. Cependant, dans un souci de clarté et pour voir figurer dans la grille toutes les atypies morphologiques susceptibles d'avoir des conséquences fonctionnelles, cette classification a été modifiée au début des années quatre-vingt-dix (Auger et Eustache, 2000 ; Tableau 21).

Tableau 21 : Evolution des critères de classification des anomalies morphologiques utilisés dans la classification de David et la classification de David modifiée

	Classification de David 1975	Classification de David modifiée 1990
Anomalies de la tête	Allongée Amincie Microcéphale Macrocéphale Irrégulière Dupliquée En lyse	Allongée Amincie Microcéphale Macrocéphale Multiples Acrosome anormal Base anormale
Anomalies de la pièce intermédiaire	Restes cytoplasmiques Angulation	Restes cytoplasmiques Angulée Grêle
Anomalies du flagelle	Absent Court Enroulé double	Absent Ecourté Calibre irrégulier Enroulé Multiple

Sur la grille de classification utilisée lors de l'examen morphologique figure également l'Index d'Anomalies Multiples ou IAM. L'IAM représente le rapport du nombre total d'anomalies recensées sur le nombre total de spermatozoïdes anormaux. L'IAM est un indicateur du nombre moyen d'anomalies associées par spermatozoïde anormal. C'est une valeur prédictive importante pour la fertilité des hommes consultant pour infertilité primaire (Jouannet *et al.*, 1988).

Les principales anomalies des spermatozoïdes définies selon la classification de David modifiée sont illustrées par les documents ci-dessous. Les anomalies de la tête, de la pièce intermédiaire et du flagelle sont considérées à part (Figure 10 à Figure 12).

Figure 10 : Représentations schématiques des anomalies de la tête selon la classification de David modifiée (Auger et Eustache, 2000).

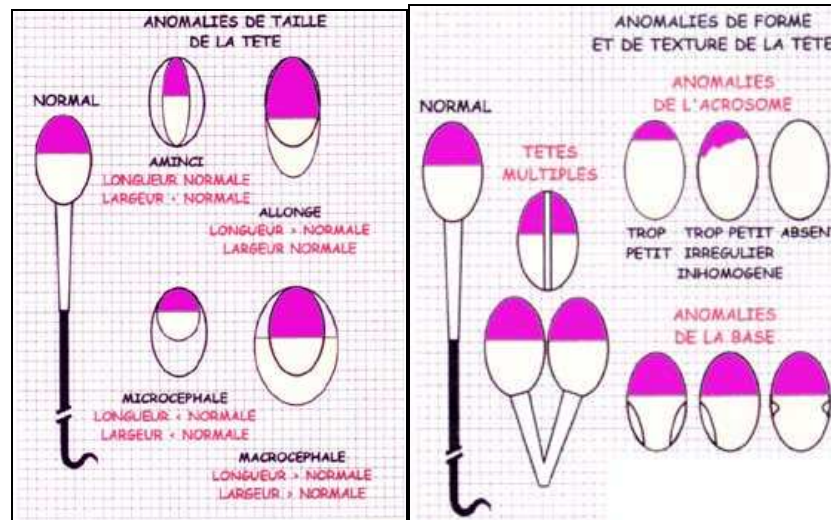


Figure 11 : Représentation schématique des anomalies de la pièce intermédiaire selon la classification de David modifiée (Auger et Eustache, 2000).

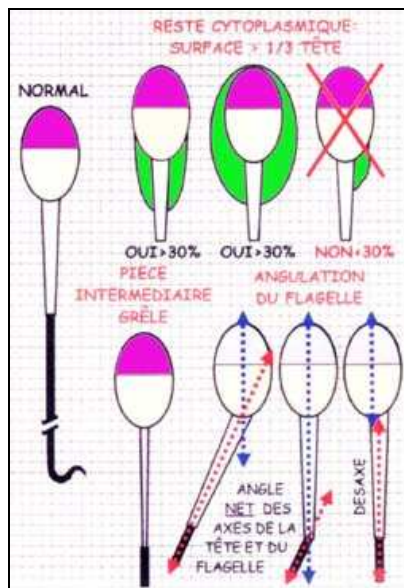
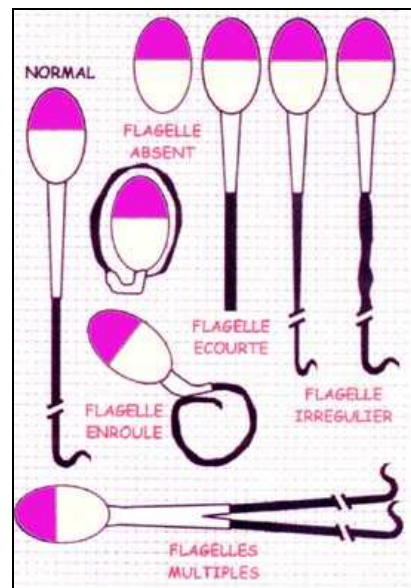


Figure 12 : Représentation schématique des anomalies du flagelle selon la classification de David modifiée (Auger et Eustache, 2000).



Lorsque les anomalies sont identifiées, on les note sur une grille celle utilisée au CECOS est donnée en exemple ci-dessous (Figure 13).

Figure 13 : Grille d'évaluation des anomalies morphologiques utilisée au CECOS de Toulouse.

N° lame :		Lecteur :			
Nom du patient :		Date :			
				Total	
ANOMALIES DE LA TÊTE	Normaux				Assoc.
	Allongé a				
	Aminci b				
	Microcéphale c				
	Macrocéphale d				
	Têtes multiples e				
	Base anormale f				
	Acrosome mal formé ou absent g				
ANOMALIES DE LA PIÈCE INTERMÉD.	Reste cytoplasmique h				
	Grêle i				
	Angulation j				
ANOMALIES DU FLAGELLE	Absent k				
	Ecourté l				
	Calibre irrégulier m				
	Enroulé o				
	Multiple p				
AUTRES ELEMENTS				IAM =	
Flagelles isolés					
Spermatozoïdes en lyse					
Polynucléaires					
Cellules de la lignée spermatique					
autres cellules					
Fragments cellulaires					

Code : 400822

3.3.2.3 Tests d'interaction sperme-glaire

a) Test post-coïtal ou test de Huhner

Lors d'infertilité du couple, le test post-coïtal est le premier test fonctionnel réalisé. Le test de Huhner est un examen facile et peu coûteux, il permet d'apprécier l'aptitude des

spermatozoïdes à pénétrer et à survivre dans le mucus cervical dans les conditions physiologiques. Quels que soient les résultats de ce test, un spermogramme et un spermocytogramme doivent être mis en œuvre car certaines anomalies n'affectant pas l'issue de ce test sont responsables d'infertilité (anomalies de l'acrosome par exemple).

Les patients viennent au laboratoire 6 à 12 heures après un rapport sexuel en période pré-ovulatoire. Des prélèvements de glaire sont effectués au niveau endocervical, exocervical et au niveau du cul de sac vaginal. La glaire déposée entre lame et lamelle est observée au microscope (grossissement x 40). Le test est positif si au moins 6 spermatozoïdes à mobilité progressive sont observés par champ (moyenne sur 10 champs). Le test est négatif si aucun spermatozoïde n'est observé. Ce résultat peut être dû à une azoospermie ou à des difficultés lors du coït. Le test est déficient si des spermatozoïdes peu mobiles ou mobiles sur place sont observés.

Si le test est déficient et l'examen du sperme normal, on refait le test après traitement d'optimisation de la glaire ou traitement d'une éventuelle infection des voies génitales de la patiente. Si le test est toujours déficient à l'issue de ces traitements, il convient de procéder au test *in vitro* de compatibilité sperme-glaire.

b) Test *in vitro* de compatibilité sperme-glaire

Il s'agit d'un test croisé où sont mis en contact, la glaire de la patiente et le sperme du patient, la glaire de la patiente et un sperme témoin et enfin, le sperme du patient et une glaire témoin. La glaire est aspirée dans des tubes capillaires qui sont déposés dans des tubes à essai et mis en contact 30 minutes avec du sperme. L'observation microscopique des tubes capillaires permet de mettre en évidence la progression des spermatozoïdes dans la glaire (en cm), la densité de pénétration (nombre de spermatozoïdes dans le champ au point le plus haut), la capacité de pénétration (différence entre le nombre de spermatozoïdes présents à 1 cm et au point le plus haut) et la survie des spermatozoïdes à 4 heures. La confrontation des résultats permet de déterminer si l'infertilité est d'origine cervicale, spermatique ou mixte.

3.3.2.4 Examens complémentaires

a) Spermoculture

Une spermoculture peut-être envisagée lors de suspicion d'infection génitale.

b) Dosages biochimiques

Les marqueurs du plasma séminal peuvent être des indicateurs de la fonction des glandes annexes et du tractus génital mâle. Il existe de nombreux marqueurs biochimiques et en général, un défaut de sécrétion d'une des glandes annexes s'accompagne d'une diminution de l'excrétion du marqueur correspondant. On utilise comme marqueurs biochimiques : la phosphatase acide et le citrate et le zinc pour la prostate ; le fructose pour les vésicules séminales ; la L-Carnitine libre, la glycéro-phosphocholine et l'activité de l'alpha glucosidase pour l'épididyme. Leur mesure permet d'établir une cartographie biochimique anatomique et/ou fonctionnelle de l'appareil génital masculin (Soufir, 1983).

c) Analyse des spermatozoïdes assistée par ordinateur (CASA = Computer Assisted Semen Analysis)

Le CECOS dispose d'un analyseur de sperme (Hamilton-Thorn Research) qui permet l'analyse assistée par ordinateur de certains paramètres séminologiques. Cette analyse n'est pas appliquée systématiquement à tous les éjaculats mais à ceux destinés à l'insémination intra-utérine et sur prescription, si le médecin demande une analyse du mouvement des spermatozoïdes. Les appareils de ce type fonctionnent grâce à une caméra couplée à un microscope et utilisent un logiciel informatique permettant de transformer le signal électrique transmis par la caméra et l'analyse des trajectoires des spermatozoïdes. Ces nouvelles technologies ont permis une certaine standardisation de l'analyse de la semence, cependant certains paramètres doivent être interprétés avec circonspection.

L'analyseur peut évaluer la concentration en spermatozoïdes du sperme, cependant, cette fonction peut conduire à une surestimation du nombre de spermatozoïdes. En effet, le système CASA ne peut pas faire la différence entre les débris cellulaires qui ont une taille semblable à celle des spermatozoïdes et les têtes de spermatozoïdes (Sharon et Mortimer, 2000). De plus en cas de faible concentration du sperme, les valeurs fournies ne sont pas fiables (Verstegen *et*

al., 2002). La détermination de la concentration du sperme humain par ce moyen n'est pas recommandée par l'Organisation Mondiale de la Santé. En outre, le système CASA peut déterminer le pourcentage de spermatozoïdes mobiles mais ce pourcentage peut être sous estimé car les débris sont comptabilisés en tant que spermatozoïdes immobiles.

Les systèmes d'analyse assistée par ordinateur permettent une évaluation objective de la morphologie de la tête (Davis et Katz, 1993) et révèlent de subtiles différences qui ne peuvent pas être mises en évidence à l'examen classique. Toutefois, au laboratoire de spermiologie du CECOS, le spermocytogramme tient aussi compte des anomalies du flagelle et de la pièce intermédiaire. L'analyse morphologique fournie par l'Hamilton ne correspond donc pas aux critères de la classification de David. Ces différentes limites expliquent le fait que l'analyseur automatique ne soit pas utilisé en routine pour l'examen morphologique et que les méthodes classiques restent encore les plus employées dans les laboratoires d'andrologie.

Cependant, l'analyseur fournit des données intéressantes sur le mouvement des spermatozoïdes. Ainsi, des valeurs cinématiques sont déterminées pour chaque spermatozoïde, comme par exemple la VLC (Curvilinear Velocity) qui reflète la distance totale que couvre la tête du spermatozoïde au cours de la période d'observation. La VSL (Straight-Line Velocity) est déterminée par la mesure de la distance entre le point d'arrivée et le point de départ, en ligne droite. Enfin la VAP (Average Path Velocity) correspond à la distance parcourue sur le trajet moyen pendant la durée d'observation. L'ALH (Amplitude of Lateral Head displacement) correspond à l'amplitude de déplacement latéral de la tête. La BCF (beat cross frequency) est la fréquence à laquelle la tête du spermatozoïde traverse la trajectoire moyenne, elle est mesurée en Hertz.

La Figure 14 présente un exemple des paramètres que peut fournir l'analyseur automatique de sperme et les Figure 15a, Figure 15b et Figure 15c représentent des exemples de trajectoires de spermatozoïdes humains.

Figure 14 : Exemple de l'analyse de la cinétique des spermatozoïdes évaluée par un système automatisé d'analyse de sperme(CECOS, 2007)

HOPITAL PAULE DE VIGUIER
 CECOS MIDI-PYRENEES
 LABORATOIRE DE SPERMIOLOGIE
 330 AVE DE GRANDE-BRETAGNE
 31059 TOULOUSE CEDEX 9

TEL : 05 67 77 10 50
 05 67 77 10 70

Docteur L.BUJAN Docteur M. DAUDIN Docteur N. Moinard

Examen du : 22/05/2007

Dossier numéro : Monsieur :
 Médecin : Conjointe :

ANALYSE DE LA CINETIQUE DES SPERMATOZOIDES

Concentration en millions par ml : 49,5
 Spermatozoides mobiles : 16 %
 Spermatozoides progressifs : 7 %
 Vitesse moyenne : 52,4 microns/seconde

Vitesse :

- rapide (V > 25 microns/s) : 16 %
- moyenne (10<V>25 microns/s) : 0 %
- lente (V<10 microns/s) : 9 %
- nulle (V=0 microns/s) 75 %

Amplitude du déplacement latéral de la tête (ALH) : 3,6

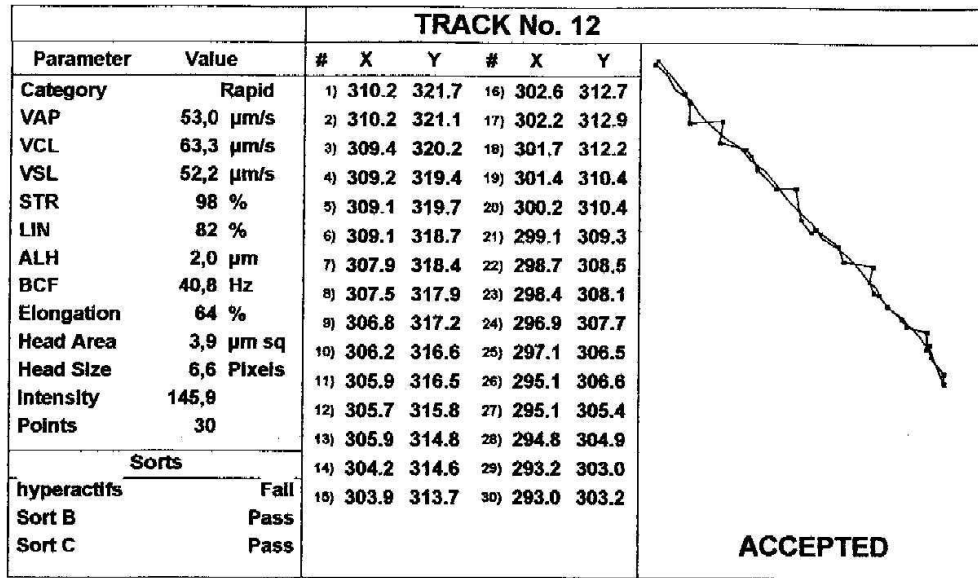
Vitesse curvilinéaire (VCL) : 79,5 microns/sec
 Vitesse progressive (VSL) : 39,9 microns/sec
 Linéarité (VSL / VCL) : 51 %

Pourcentage de spermatozoides à mouvement hyperactif : 3 %
 Surface moyenne de la tête : 3,5 microns² élancement : 78 %

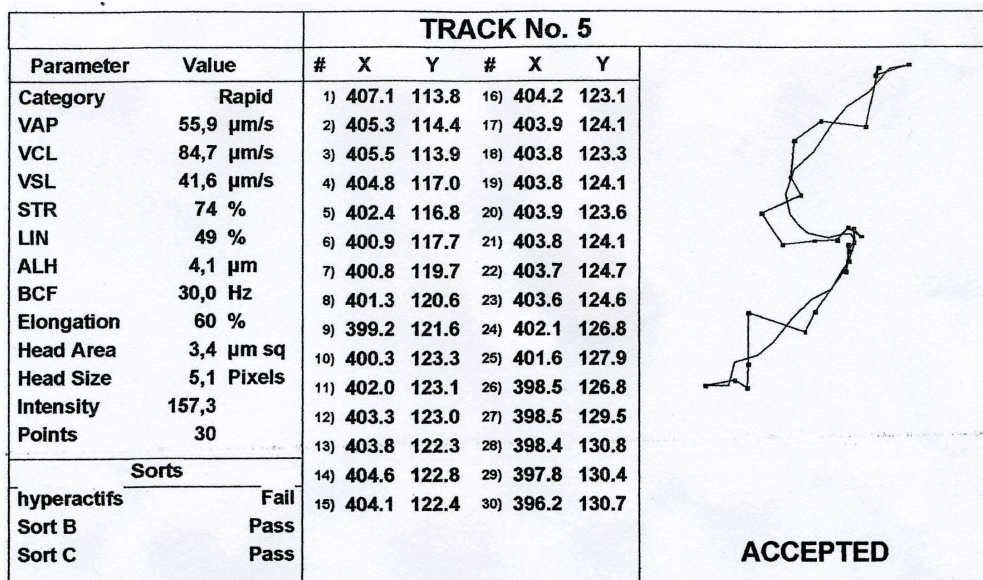
Remarques : TEST DE SURVIE A LIQUEFACTION

Analyse effectuée grace à un système automatisé (HTM IVOS version □
 12.3) à 60 images par seconde, sur 155 spermatozoides sur 1 champs à □
 37,0 C; prelevement effectué au laboratoire à 12H20.

Figure 15 : Exemples de trajectoires de spermatozoïdes humains évaluées par un système automatisé d'analyse de sperme (CECOS, 2007).



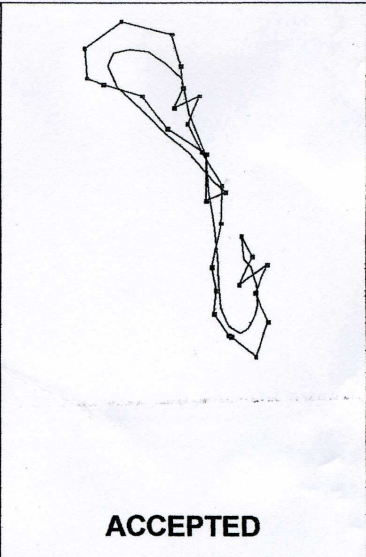
a) Ce tracé représente la trajectoire d'un spermatozoïde à mobilité rapide et progressive. La trajectoire du spermatozoïde est quasiment rectiligne. Par conséquent la VCL est peu élevée, en revanche, la VSL est grande. Les valeurs de la VSL et de la VCL sont proches car le spermatozoïde a une trajectoire presque linéaire.



b) Ce tracé représente la trajectoire d'un spermatozoïde mobile. Sa trajectoire est moins rectiligne que celle du tracé précédent. La VCL est supérieure à celle du tracé

précédent, par contre la VSL est plus petite. Le spermatozoïde a donc parcouru moins de distance linéairement même si le trajet réel parcouru était plus long.

		TRACK No. 12					
Parameter	Value	#	X	Y	#	X	Y
Category	Slow	1)	96.4	163.8	16)	95.8	162.7
VAP	35,7 $\mu\text{m/s}$	2)	95.9	164.0	17)	96.3	163.6
VCL	51,3 $\mu\text{m/s}$	3)	95.9	162.7	18)	96.3	164.6
VSL	2,6 $\mu\text{m/s}$	4)	94.8	162.0	19)	96.0	165.7
STR	7 %	5)	94.1	161.2	20)	96.1	166.4
LIN	5 %	6)	93.1	160.9	21)	96.1	167.0
ALH	1,6 μm	7)	92.6	160.7	22)	96.5	167.6
BCF	31,1 Hz	8)	92.6	159.9	23)	96.6	167.6
Elongation	64 %	9)	93.6	159.2	24)	97.2	168.1
Head Area	5,1 $\mu\text{m sq}$	10)	94.9	159.5	25)	97.6	167.2
Head Size	6,4 Pixels	11)	95.2	160.4	26)	97.2	166.4
Intensity	157,5	12)	95.3	161.0	27)	97.5	165.7
Points	30	13)	95.0	161.5	28)	96.8	166.2
Sorts		14)	95.7	161.2	29)	97.1	165.5
hyperactifs	Fail	15)	95.4	161.9	30)	96.8	164.9
Sort B	Pass						
Sort C	Pass						



ACCEPTED

- c) Ce tracé représente la trajectoire d'un spermatozoïde mobile. Cependant, la trajectoire n'est pas rectiligne mais forme des boucles. La VSL est donc particulièrement faible même si la distance totale parcourue est grande, car le point d'arrivée est très proche du point de départ sur la période d'observation considérée.

3.4 Résumé de l'évaluation des paramètres séminologiques dans les espèces bovine, canine et humaine

Le Tableau 22 récapitule toutes les méthodes utilisées en routine pour lors de l'analyse du sperme dans les 3 espèces considérées..

Tableau 22 : Tableau récapitulatif des méthodes utilisées en routine pour l'évaluation de la qualité de la semence dans les espèces bovine, canine et humaine.

	Méthode utilisée dans l'espèce bovine	Méthode utilisée dans l'espèce canine	Méthode utilisée chez l'homme
Examen macroscopique	Observation visuelle : volume, couleur, viscosité.	Observation visuelle : volume, couleur, viscosité.	Observation visuelle : volume, couleur, viscosité et mesure pH.
Motilité massale	Observation microscopique. Note de 0 à 5.	Observation microscopique. Note de 0 à 5.	Paramètre non évalué.
Motilité individuelle	Paramètre non évalué en routine.	Observation microscopique	Observation microscopique et CASA
Concentration	Spectrophotométrie.	Observation microscopique. Cellule hématimétrique.	Observation microscopique. Cellule hématimétrique.
Vitalité	Paramètre non évalué en routine.	Observation microscopique d'un frottis coloré en éosine-nigrosine.	Observation microscopique d'un frottis coloré en éosine-nigrosine.
Morphologie	Paramètre non évalué en routine.	Observation microscopique d'un frottis coloré en éosine-nigrosine	Observation microscopique d'un frottis : coloration de Papanicolaou modifiée.
Interaction sperme-glaire cervicale	Paramètre non évalué.	Paramètre non évalué.	Test de Huhner +/- test <i>in vitro</i> sperme-glaire.

Globalement, les paramètres évalués pour l'analyse de la qualité de la semence sont les même chez le bovin, le chien et l'homme. Les techniques employées peuvent différer pour s'adapter aux contraintes de la filière considérée et à la finalité de l'examen. Par exemple, la concentration de l'éjaculat est évaluée au spectrophotomètre pour des questions de rapidité en filière bovine et car la précision avec cette méthode est suffisante pour les objectifs de dilution. Certaines techniques sont employées préférentiellement dans une espèce par habitude ou pour des questions de facilité de mise œuvre (choix des colorations, utilisation de la motilité massale ou individuelle...). Le test de compatibilité sperme-glaire cervicale est un test fonctionnel important qui est utilisé chez l'homme car la fertilité est envisagée de façon individuelle dans cette espèce et non pas de façon globale comme chez les animaux de rente.

4 LIMITES DES TECHNIQUES CLASSIQUES D'EXAMEN DU SPERME ET PERSPECTIVES POUR LE FUTUR

4.1 Principales limites de l'examen classique du sperme

4.1.1 Subjectivité et répétabilité des méthodes classiques d'examen de la semence

Le choix de la méthode employée par le laboratoire doit tenir compte du coût de l'analyse, de la facilité de mise en œuvre des techniques mais aussi du nombre d'échantillons à analyser quotidiennement. L'examen de la qualité du sperme est effectué en routine par observation microscopique d'un échantillon par un opérateur, cette méthode dite « classique » peut être mise en œuvre avec un équipement de base peu coûteux. **Cependant, l'examen de routine de la semence (et en particulier l'analyse de la motilité) est par nature un examen subjectif. On déplore une certaine variabilité intra et inter-laboratoires mais également une variabilité intra et inter-opérateurs.** Cette variabilité de l'évaluation des paramètres séminologiques peut avoir des répercussions sur la décision d'utilisation ou de rejet de l'éjaculat et dans le cadre d'échanges commerciaux entre laboratoires ou entre pays.

Des résultats obtenus dans 10 équipes différentes (Auger *et al.*, 2000) ont conclu que la moyenne des coefficients de variation inter-individuelle était de 22,9% pour l'estimation de la concentration, 21,8% pour la motilité et 17,5% pour la vitalité. Un effet opérateur a été mis en évidence pour la motilité et la vitalité mais pas pour la détermination de la concentration. La variabilité intra-opérateur est d'autant plus élevée que l'opérateur est inexpérimenté. Cette étude souligne donc la nécessité de contrôles internes et externes dans les laboratoires d'analyse de la semence.

La comparaison entre les méthodes conventionnelles et l'analyse assistée par ordinateur a été effectuée pour l'examen morphologique du sperme (Marnet *et al.*, 2000). La variation intra-opérateur est beaucoup plus élevée pour les méthodes conventionnelles d'examen de la morphologie que pour la méthode assistée par ordinateur (coefficient de variation = 0,43 pour

les méthodes conventionnelles contre 0,08 pour l'analyse assistée par ordinateur). Cette étude a conclu que l'analyse morphologique assistée par ordinateur présente une valeur prédictive légèrement supérieure aux techniques conventionnelles mais surtout une reproductibilité bien supérieure, permettant la standardisation. Des études sur la comparaison de l'évaluation de la mobilité des spermatozoïdes par des méthodes manuelles et des méthodes assistées par ordinateur (Walker *et al.*, 1982) ont montré que l'exactitude de l'observation visuelle est élevée lorsque le pourcentage de spermatozoïdes doté d'une mobilité progressive et parcourant au moins 30µm / seconde n'est pas compris entre 34 et 57%. En effet, dans cet intervalle, l'évaluation subjective est erronée dans 93% des cas. La motilité est le paramètre le plus subjectif lors de l'évaluation de la qualité de la semence.

4.1.2 Standardisation et formation

Dans les centres d'examen de la semence de type CECOS, les méthodes utilisées ne sont pas complètement standardisées malgré les recommandations de l'Organisation Mondiale de la Santé. En effet, le guide de l'OMS recommande plusieurs techniques pour certaines étapes de l'examen du sperme (par exemple plusieurs colorations sont possibles pour l'examen morphologique, car aucune des techniques proposées n'a montré de supériorité par rapport à une autre). De plus, il existe différentes publications de ce manuel et tous les laboratoires ne se conforment pas à la même édition. **Les variations observées lors de l'examen morphologique des spermatozoïdes sont dues au manque de standardisation des méthodes d'examen et de formation mais également choix de la classification des anomalies morphologiques des spermatozoïdes (Davis *et al.*, 1995). Il est actuellement reconnu qu'une formation standardisée conduit à une réduction immédiate de la variabilité inter-opérateur dans l'examen de la semence.** Cependant elle est lourde à mettre en œuvre car elle implique une formation théorique ainsi que des sessions pratiques répétées et un suivi régulier des résultats (Björndahl *et al.*, 2002).

Dans la filière bovine, malgré le rôle important de l'UNCEIA, la standardisation entre les CEIA n'est pas parfaite. Les méthodes employées et le matériel à disposition pour l'examen de la semence différent entre les centres. La formation des chefs de centre d'insémination dans la filière bovine a été définie par l'Arrêté du 21 Novembre 1991 qui prévoit des sessions de formation organisées par le centre d'enseignement zootechnique de Rambouillet. Le

programme de la session et la nature de l'épreuve sont définis par le Ministère de l'Agriculture après avis de la commission nationale d'amélioration génétique. Cependant, en raison de l'ouverture du marché européen de l'Insémination Artificielle bovine et de la fin de la loi sur l'élevage du 28 décembre 1966, la formation des chefs de centre n'existe plus depuis le 31 décembre 2006. Une habilitation est désormais délivrée aux opérateurs de centres de collecte et de stockage de la semence. De plus, dans les centres d'insémination, d'autres personnes (laborantins, techniciens...) effectuent également les examens du sperme sans avoir reçu au préalable de formation spécialisée dans ce domaine. **A noter qu'en dehors de ces formations, les opérateurs de ces centres spécialisés ont peu l'occasion d'échanger sur les problèmes techniques relatifs à la collecte et à l'évaluation de la qualité de la semence.**

Les centres d'examen de la semence canine en France (à savoir les 4 banques de semence) ne présentent pas de standardisation des méthodes employées. Cependant, les dirigeants des 4 structures se réunissent annuellement pour tenter d'harmoniser les procédures. Au CERCA par exemple, différents opérateurs peuvent intervenir dans la journée, ce qui est une source de variabilité au sein du laboratoire. De plus, il n'y a pas de formation standardisée pour l'examen du sperme, les opérateurs sont formés au sein du laboratoire par d'autres opérateurs plus expérimentés.

4.1.3 Durée de l'analyse et nombre de cellules analysées

Une autre limite de l'examen de la semence par les méthodes classiques est la durée de l'analyse. Les étapes les plus longues sont l'évaluation de la concentration de spermatozoïdes dans l'éjaculat et l'analyse morphologique. **L'examen conventionnel du sperme ne permet d'analyser qu'un faible nombre de spermatozoïdes dans un intervalle de temps raisonnable, cela représente une source de variabilité non négligeable. De plus, compte tenu du faible nombre de cellules analysées, la population de spermatozoïdes analysée n'est pas forcément représentative de celle présente dans l'éjaculat.**

Il a été démontré récemment que le comptage d'un grand nombre de cellules (300 à 400 approximativement) améliore la précision de l'évaluation de la concentration de l'éjaculat (Christensen *et al.*, 2005). De plus, bien que l'évaluation de la concentration en

spermatozoïdes avec les cellules hématimétriques soit considérée comme la méthode de référence (Mahmoud *et al.*, 1997) il a été montré que certaines méthodes récentes et plus rapides (comme la cytométrie de flux et la spectrophotométrie) présentent une meilleure répétabilité que les techniques classiques avec une précision identique (Prathalingam *et al.*, 2006).

4.1.4 Relation entre les paramètres observés classiquement et la fertilité

La relation entre la fertilité évaluée *in vitro* et la fertilité *in vivo* n'est toujours pas clairement établie. Chez l'homme, excepté lors d'azoospermie, l'examen microscopique de la semence considéré isolément n'est pas un bon prédicteur de la fertilité (Jequier, 2005). La motilité est une expression de la viabilité et de l'intégrité structurale du spermatozoïde. Chez le taureau, les éjaculats produits dans les centres d'insémination artificielle présentent généralement une bonne mobilité. Cependant, la corrélation entre la mobilité des spermatozoïdes et les taux de non retour à l'insémination artificielle est faible (Stalhammar *et al.*, 1994). Par ailleurs, certaines anomalies morphologiques n'ont pas de répercussion sur la fertilité, comme l'illustre le cas d'un taureau Charolais utilisé dans la filière de l'insémination artificielle dont 24 à 36% des spermatozoïdes présentaient une anomalie morphologique au niveau de la pièce intermédiaire sans effet apparent sur la motilité ou sur la fertilité de l'animal (Rocha *et al.*, 2006).

Afin de déterminer la relation entre un paramètre séminologique mesuré *in vitro* et la fertilité *in vivo*, il faut disposer non seulement de tests de laboratoires spécifiques du paramètre à évaluer, précis et exacts mais également de données sur la fertilité (Amann, 1989), ce qui n'est pas facile. En médecine humaine, la relation entre la qualité du sperme et la fertilité est impossible à évaluer pour des raisons d'éthique mais aussi car, pour les techniques de procréation médicalement assistée les mécanismes impliqués dans la fécondation *in vivo* sont court-circuités. Chez les bovins, il est possible d'obtenir des résultats de fertilité pour chaque taureau mais il est plus difficile de les associer à un éjaculat donné. La mise en place d'une traçabilité efficace dans la filière de l'insémination artificielle (système de code barre sur les paillettes de semence congelée et lecture lors de la mise en place de la semence) et la base de données sur la fertilité bovine devrait permettre d'établir une relation entre la qualité séminologique et la fertilité *in vivo*. Il restera néanmoins à analyser cette relation sur

différents éjaculats. Il s'agit d'un travail considérable, d'autant plus que la fertilité repose sur de nombreux critères liés à la complexité structurale et fonctionnelle du spermatozoïde. Parallèlement à cette analyse de la relation entre les paramètres séminologiques et la fertilité, de nouvelles techniques sont développées pour évaluer la fertilité *in vitro*.

4.2 Les perspectives envisageables en complément des méthodes classiques

Compte tenu des limites de l'examen de routine du sperme, de nouvelles méthodes d'analyse du sperme, plus répétables et plus exactes font l'objet d'études. L'enjeu est de trouver des paramètres corrélés de façon significative à la fertilité et possédant une valeur prédictive correcte. **Actuellement, aucun paramètre pris isolément n'est corrélé de façon satisfaisante à la fertilité. Il s'agit donc de développer un ensemble de tests qui pourrait compléter l'examen conventionnel du sperme et améliorer sa fiabilité.**

Ainsi, les méthodes microscopiques conventionnelles pourraient peu à peu être complétées par les méthodes d'analyse assistées par ordinateur (déjà utilisées ponctuellement), les colorations fluorescentes et les tests d'interaction spermatozoïde-ovocyte. L'intérêt de ces tests fonctionnels a été souligné dans de nombreux laboratoires et l'Organisation Mondiale de la Santé les a inclus dans son manuel de laboratoire sous la catégorie des « tests fonctionnels ».

4.2.1 Analyse du sperme assistée par ordinateur (Computer Assisted Sperm Analysis = CASA)

Les systèmes d'analyse assistée par ordinateur permettent d'analyser de nombreux paramètres (tels que la concentration, la motilité, la vélocité et la morphologie du spermatozoïde) sur un grand nombre de spermatozoïdes avec une grande répétabilité. La méthode a été décrite dans le paragraphe 3.3.23. Cependant, de nombreux biais peuvent exister. C'est pourquoi, la standardisation et les contrôles qualité sont des pré-requis essentiels. La formation de l'opérateur est également primordiale pour assurer la fiabilité et la répétabilité des résultats. La comparaison avec des méthodes manuelles qui ont démontré leur précision et leur fiabilité est essentielle (par exemple la concentration de l'éjaculat évaluée à la cellule

hématimétrie). Les méthodes d'utilisation du système doivent être parfaitement définies et clairement décrites, enfin, le traitement des échantillons à analyser (protocoles de lavage, centrifugation, fixation et coloration) doit être standardisé. Toutefois, même s'ils peuvent apporter une certaine objectivité en comparaison à l'examen manuel du sperme, ces analyseurs évaluent les mêmes paramètres que ceux évalués classiquement par l'opérateur, la question de la relation entre les paramètres mesurés et la fertilité reste entière.

En France, actuellement, les CECOS ou les laboratoires de Procréation Médicalement Assistée sont équipés d'appareils d'analyse assistée par ordinateur (CASA). L'utilisation de CASA s'est développée ces quinze dernières années parallèlement au développement de la Procréation Médicalement Assistée. Le CASA est principalement utilisé lors des tests de préparation de sperme avant l'insémination intra-utérine. En général cet équipement est utilisé en complément et non en substitution des méthodes d'analyse microscopique. En clinique, ces appareils peuvent être utiles pour dépister des anomalies de mobilité des spermatozoïdes. Cependant l'évaluation conventionnelle de la mobilité ou le test de Huhner permettent également de mettre en évidence des troubles graves de la motilité des spermatozoïdes. D'après les laboratoires d'andrologie, le champ d'application du CASA concerne essentiellement la recherche ou les études toxicologiques. Ces appareils ont été mis au point initialement pour un usage en médecine humaine, par la suite ils ont été paramétrés de façon à être utilisables dans différentes espèces animales (dont les espèces bovine, canine, équine et porcine).

Actuellement, en France, très peu de centres d'insémination artificielle bovine sont équipés d'appareils d'analyse du sperme assistée par ordinateur en raison notamment de leur coût. Trois centres d'insémination artificielle disposent de cet équipement il s'agit des centres Gènes Diffusion Optimal (coopérative du Nord), de l'URCEO (grand Ouest) et de l'un des centres d'Amelis (Normandie-Mayenne). Les analyseurs automatiques apportent des précisions utiles concernant la motilité et la morphologie, avec une bonne répétabilité. Cependant, ils ne peuvent pas se substituer entièrement à l'examen séminologique classique et ne permettent pas de classer les taureaux comme « satisfaisant » ou « insatisfaisant » pour la production de sperme l'examen précédant la phase de testage (Palmer, C.W. Barth, A.D. 2003).

Bien que l'utilisation de CASA (Hamilton-Thorn) soit validée dans l'espèce canine depuis 2001 (Iguer-ouada et Verstegen, 2001), ce système n'est pas utilisé actuellement, en France, dans les 4 centres d'insémination, en raison du coût élevé de l'équipement et du faible développement de l'insémination artificielle en semence congelée.

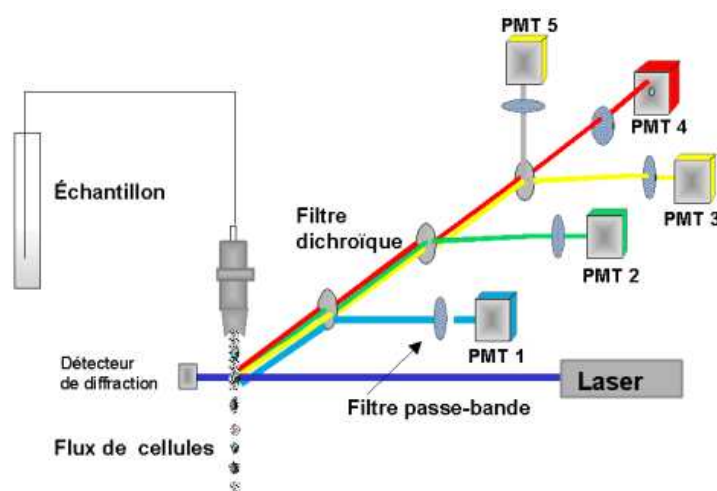
4.2.2 Tests de coloration fluorescente

Au cours des dix dernières années, différents marqueurs fluorescents ont été développés pour tester les capacités fonctionnelles des spermatozoïdes : intégrité de la membrane plasmatique, capacitation, réaction acrosomique et niveau de condensation de la chromatine. L'interprétation des tests basés sur l'utilisation de marqueurs fluorescents nécessite le recours à la microscopie à fluorescence ou à la cytométrie de flux.

4.2.2.1 Principe de la cytométrie de flux : application aux marquages fluorescents

La cytométrie de flux est une technique de caractérisation individuelle, quantitative et qualitative de particules en suspension dans un liquide. La Figure 16 illustre le principe du fonctionnement du cytomètre de flux.

Figure 16 : Principe de fonctionnement du cytomètre de flux (d'après Robinson, 1999).



Les cellules sont aspirées par un système de pompe et envoyées une à une devant un faisceau laser qui permet de les mesurer ou d'évaluer des paramètres cellulaires. Les signaux relatifs aux propriétés optiques intrinsèques de la particule analysée ou à sa fluorescence sont séparés par des filtres optiques (filtres dichroïques) et collectés par des photo-multiplieurs (PMT) Ces informations sont transmises à un ordinateur qui les transcrit. La lumière diffractée mesurée en face du rayon laser permet d'évaluer la taille des cellules (paramètre FSC). La lumière diffractée, mesurée à 90° (paramètre SSC) donne une mesure de la granulosité de la cellule, c'est-à-dire de la complexité interne de la cellule considérée. L'utilisation de fluorochromes (colorants fluorescents) permet de détecter, de manière spécifique, la présence de certaines molécules, on choisit le fluorochrome en fonction du marqueur que l'on veut mettre en évidence.

Les avantages de la cytométrie de flux par rapport à la microscopie sont multiples, en effet plusieurs milliers de cellules sont analysés en 10 secondes et les résultats obtenus sont plus précis et plus exacts. La cytométrie de flux ouvre de nouvelles perspectives en andrologie (utilisation des marqueurs fluorescents, sexage de la semence...) cependant, le coût de l'équipement limite l'utilisation de cette technique en clinique.

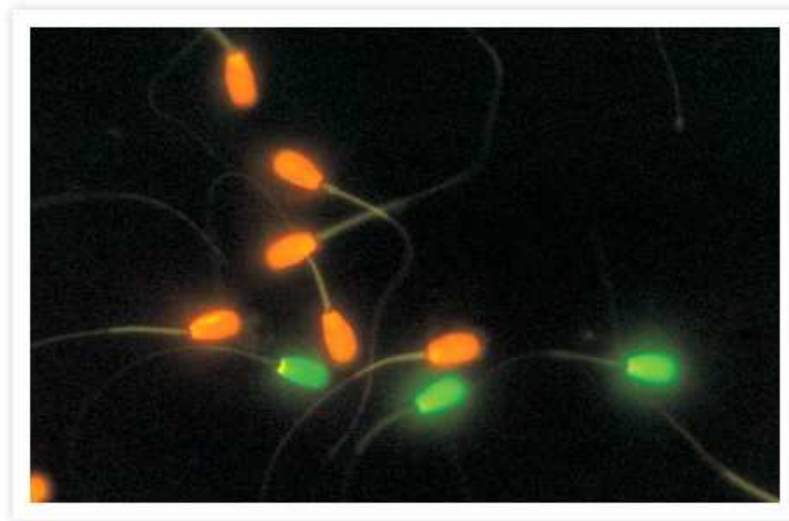
4.2.2.2 Intégrité de la membrane plasmique

L'intégrité membranaire est essentielle pour garantir la capacité fécondante du spermatozoïde. Habituellement, l'intégrité de la membrane plasmique est évaluée par coloration et observation en microscopie optique.

De nombreux fluorochromes peuvent être utilisés pour évaluer l'intégrité membranaire : par exemple la combinaison Carboxyfluorescein diacetate (CFDA) et Propidium Iodide (PI) ou encore carboxymethylfluorescein diacetate (CMFDA), Pisum Sativum Agglutinin (PSA) et PI ou l'association SYBR-14 et PI. La plupart des réactions de ces combinaisons de fluorochromes sont temps-dépendantes car elles sont basées sur la conversion enzymatique d'un substrat en un produit fluorescent. Dans le cas de l'association SYBR-14 et PI, on ne constate pas de relation de type temps-dépendante car ces molécules se lient à l'ADN du spermatozoïde qui est un constituant stable (Garner et Johnson, 1995).

L'examen en microscopie à fluorescence révèle que les spermatozoïdes vivants sont colorés en vert par le SYBR-14 qui s'intègre à l'ADN. Cette molécule est capable de pénétrer à travers la membrane plasmique de cellules intactes. Les spermatozoïdes morts ayant perdu leur intégrité membranaire sont colorés en rouge par le PI. Enfin, on distingue une troisième population de spermatozoïdes colorés à la fois en vert et en rouge, il s'agit des spermatozoïdes moribonds dont la perméabilité membranaire est altérée. La Figure 17 illustre l'aspect en microscopie à fluorescence d'un mélange de spermatozoïdes morts et vivants colorés avec le mélange SYBR et PI (Garner et Johnson, 1995).

Figure 17 : Spermatozoïdes morts et vivants colorés avec le mélange SYBR et PI (Garner et Johnson, 1995).



Cette coloration a été validée dans 6 espèces différentes : bovin, porc, ovin, lapin, souris et homme (Garner et Johnson, 1995). **En comparaison à la coloration à l'éosine-nigrosine, SYBR-14/PI est une méthode beaucoup plus sensible qui permet de mettre en évidence des dommages membranaires subtils.**

4.2.2.3 Réaction acrosomique

La réaction acrosomique est un pré-requis essentiel pour la pénétration de l'ovocyte par le spermatozoïde. La fusion de la membrane plasmique avec la membrane acrosomiale externe

permet la libération du contenu enzymatique de l'acrosome et par conséquent la pénétration de la zone pellucide.

Une réaction acrosomique trop précoce (réaction acrosomique spontanée) ne permet pas au spermatozoïde de se fixer à la zone pellucide. *A contrario*, un spermatozoïde n'ayant pas effectué sa réaction acrosomique ne peut pas fusionner avec l'ovocyte. La réaction acrosomique est induite *in vivo* par plusieurs molécules, notamment par la progestérone sécrétée par les cellules du cumulus oophorus. La liaison du spermatozoïde à la ZP3 va également activer des récepteurs intraspermiques et déclencher des voies enzymatiques impliquées dans la réaction acrosomique (Patrat *et al.*, 2000).

Pour évaluer la qualité du sperme le test le plus pertinent consiste à déclencher la réaction acrosomique et à estimer la proportion de spermatozoïdes vivants qui sont capables d'effectuer ce processus. La réaction acrosomique est généralement déclenchée par l'incubation avec un ionophore calcium (A23187) et de la progestérone. Le statut acrosomial peut-être évalué à l'aide de colorations non fluorescentes telles que l'éosine-nigrosine, le giemsa, la triple coloration bleu de trypan/ marron bismark/ rose bengale ou encore le Spermac®. Cependant, récemment, plusieurs marqueurs fluorescents du statut acrosomial ont été validés (Cross et Meizel, 1989).

Le statut acrosomial est majoritairement évalué à l'aide de lectines liées la fluorescéine isothyocyanate (FITC) par exemple, la « Peanut Agglutinin » (FITC-PNA) ou la « Pisum Sativum Agglutinin » (FITC-PSA). Ces lectines se lient de façon spécifique à des composés glycosylés de la membrane acrosomiale externe. Si l'acrosome est intact, cette liaison engendre une fluorescence très nette de la région acrosomiale alors qu'aucune fluorescence (ou éventuellement une fluorescence du segment équatorial) n'apparaît en cas d'acrosome endommagé ou ayant réagi (Cheng *et al.*, 1996).

D'autres techniques comme l'immunofluorescence indirecte au moyen d'anticorps polyclonaux ou monoclonaux ainsi que la coloration à la chlortétracycline (antibiotique aux propriétés fluorescentes) peuvent également être utilisées pour évaluer le statut acrosomial.

Le pourcentage de cellules présentant un acrosome intact et la capacité d'effectuer la réaction acrosomiale après induction sont considérés comme des paramètres

fonctionnels importants chez de nombreux mammifères. L'évaluation du statut acrosomique pourrait être complémentaire des méthodes classiques d'analyse de la qualité du sperme cependant ce test fonctionnel n'est pour le moment pas employé en routine.

4.2.2.4 Capacitation

La capacitation correspond à l'ensemble des modifications intra-cellulaires et membranaires que doit subir le spermatozoïde avant d'être capable de féconder l'ovocyte. La capacitation fait en autres intervenir des modifications membranaires avec des réorganisations de phospholipides et redistribution du cholestérol, des réarrangements des protéines de membrane, des phosphorylations de protéines AMPc dépendantes et des modifications ioniques importantes (augmentation des concentrations en Ca^{2+} notamment). Elle a lieu dans les voies génitales femelles. Les conséquences de la capacitation sont l'hyperactivation du mouvement, l'exposition de récepteurs spermatiques à la zone pellucide, l'aptitude à effectuer la réaction acrosomique et la capacité à fusionner avec la membrane ovocytaire.

Par conséquent, la capacitation peut être évaluée par analyse assistée par ordinateur du mouvement du spermatozoïde, une hyperactivité signifie que la capacitation a eu lieu. L'induction de la réaction acrosomiale, le test de fixation à la zone pellucide et le test de pénétration d'ovocytes de hamster dépellucidés peuvent également mettre en évidence, indirectement, les spermatozoïdes capités (Rijsselaere, 2005).

La Chlortétracycline (CTC), un antibiotique fluorescent permet d'évaluer le statut capacité ou non capacité du spermatozoïde ainsi que la réaction acrosomiale. En traversant la membrane plasmique, la chlortétracycline se lie aux ions Ca^{2+} libres, le complexe Ca^{2+} / CTC ainsi formé est fluorescent. Plus la fluorescence est intense, plus la membrane est désorganisée. Il a été démontré chez plusieurs mammifères que trois populations de spermatozoïdes peuvent être isolées : les spermatozoïdes non capités et n'ayant pas effectué la réaction acrosomique (« F »), les spermatozoïdes capités et n'ayant pas effectué la réaction acrosomique (« B ») et enfin les spermatozoïdes capités et ayant effectué la réaction acrosomique (« AR ») (Collin *et al.*, 2000 ; Guérin *et al.*, 1999).

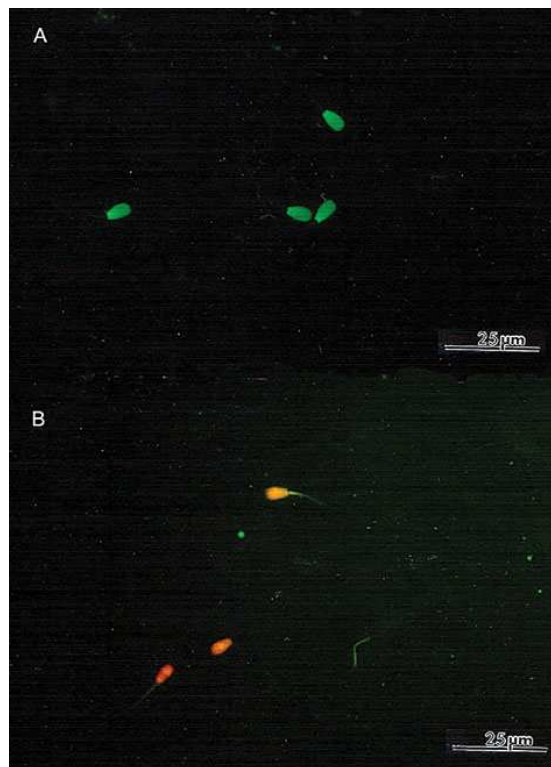
L'interprétation de ces tests dans un contexte clinique est actuellement peu maîtrisée. Par conséquent, la capacitation n'est pas un critère pris en compte couramment dans l'analyse de la semence.

4.2.2.5 Etat de condensation de la chromatine

La chromatine du spermatozoïde possède une structure compacte hautement organisée composée d'ADN et de nucléoprotéines. La nature insoluble et condensée de cette chromatine protège l'intégrité génétique de la cellule pendant le transport dans les voies génitales mâles et femelles. La condensation du matériel génétique permet aussi de reprogrammer le génome paternel et de mettre en place les gènes qui devront s'exprimer au cours des premières étapes du développement embryonnaire. C'est pourquoi, il est aujourd'hui reconnu que la condensation de la chromatine du spermatozoïde est essentielle pour la pleine expression de la fertilité (Braun, 2001).

Des tests d'évaluation de la structure de la chromatine ont été mis au point (Sperm Chromatin Structure Assay = SCSA). Il s'agit d'une méthode de cytométrie de flux qui mesure le degré de dénaturation de l'ADN et évalue ainsi de façon objective l'intégrité de la chromatine. Cette technique est basée sur l'hypothèse selon laquelle la chromatine endommagée est plus sensible à la dénaturation. Dans un premier temps, les spermatozoïdes sont soumis à un traitement acide capable de dénaturer l'ADN si la chromatine est endommagée. La coloration à l'acridine orange (qui s'intercale dans l'ADN et produit une réaction fluorescente) permet de mettre en évidence le degré de décondensation de la chromatine.

Figure 18 : Test à l'acridine orange appliqué à des spermatozoïdes de taureau (Martins *et al.*, 2007).



A. Spermatozoïdes dont la chromatine est intacte, colorés en vert.

B. Spermatozoïdes dont la chromatine est endommagée, colorés en rouge.

Les spermatozoïdes dont la chromatine est intacte apparaissent verts car l'acridine orange intégrée à l'ADN double brin émet une fluorescence verte. Les spermatozoïdes dont la chromatine est endommagée apparaissent rouges car l'acridine orange liée à l'ADN simple brin émet dans le rouge.

Chez de nombreuses espèces de mammifères, notamment chez le taureau, il a été démontré que les altérations de la chromatine étaient négativement corrélées à la fertilité (Ballachey, 1987). Chez l'homme le taux de chromatine altérée est significativement plus élevé chez les sujets infertiles que chez les sujets témoins (Foresta, 1989).

L'hétérogénéité de la chromatine est corrélée à la fertilité et pourrait être un complément intéressant de l'examen microscopique du sperme. Au CECOS de Toulouse, les seuls tests fonctionnels utilisés sont les tests d'évaluation d'intégrité de la chromatine. Le test TUNEL est utilisé pour détecter la fragmentation de l'ADN et le Sperm

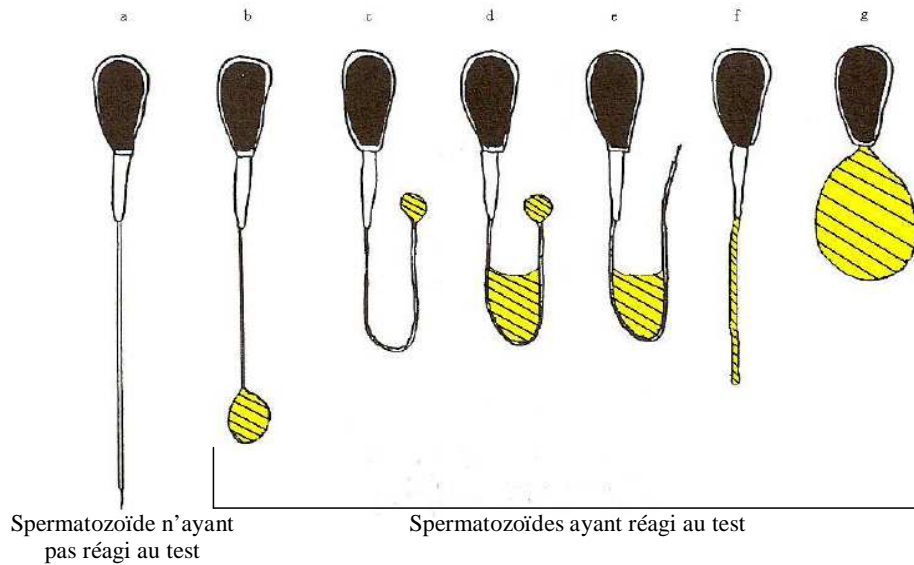
Chromatin Structure Assay pour l'étude de la chromatine. Ces tests sont avant tout utilisés en cas de fausses couches à répétition, de stérilités inexplicables et d'échec lors de tentatives de Procréation Médicalement Assistée.

4.2.3 Test hypoosmotique

L'intégrité membranaire est indispensable à la fécondation car la membrane plasmique intervient dans la capacitation, la réaction acrosomique et l'attachement des gamètes (Jeyendran, 1984). L'une des propriétés de la membrane plasmique est sa capacité à transporter des molécules de façon sélective. Dans des conditions hypoosmotiques, la cellule va permettre l'entrée de molécules d'eau à travers sa membrane plasmique dans le but d'équilibrer les concentrations intra et extra-cellulaire. Ce flux d'eau entraîne une augmentation du volume intra-cellulaire. Ce phénomène est particulièrement visible au niveau de la queue des spermatozoïdes (Jeyendran, 1984). Le test hypoosmotique vise à mettre en évidence les propriétés physiques de la membrane plasmique.

Pour réaliser ce test, la semence est mélangée à une solution hypotonique dont la composition et l'osmolarité sont déterminées pour chaque espèce. Le mélange est incubé à 37°C, puis les spermatozoïdes sont observés au microscope à contraste de phase. Les spermatozoïdes dont la membrane est intègre se déforment. Ces spermatozoïdes se reconnaissent à leur flagelle qui se recourbe ou s'enroule. Selon la forme qu'ils prennent, ils sont classés en sept catégories de « a » à « g » (Figure 19).

Figure 19 : Modifications morphologiques des spermatozoïdes soumis au test hypoosmotique. (D'après Jeyendran, 1984).



Les études sur la réponse au test hypoosmotique et sa relation avec la fertilité sont divergentes. Il existe une corrélation entre la réponse au test hypoosmotique et la fécondation *in vitro* chez l'homme (Van Der Ven et *al.*, 1986) cependant aucune corrélation n'est clairement établie avec le test de pénétration de la zone pellucide (Rogers et Parker, 1991). La relation entre le test hypoosmotique et la fécondation *in vivo* reste à démontrer. Une meilleure connaissance des conditions de réalisation de ce test (osmolarité, temps d'incubation et température) est nécessaire avant que ce test hypoosmotique ne soit utilisable en routine (Van Der Ven et *al.*, 1986 ; Bacinoglu et *al.*, 2008).

Le test hypoosmotique est un test rapide et simple à réaliser. Cependant, les controverses concernant l'interprétation de ce test ainsi que sa relation avec les paramètres classiquement évalués et avec la fertilité n'ont pas favorisé son développement. Des recherches sont encore nécessaires afin d'optimiser les conditions permettant d'évaluer la perméabilité membranaire et d'approfondir la connaissance des paramètres évalués par ce test.

4.2.4 Test d'interaction spermatozoïde-ovocyte

4.2.4.1 Test de liaison à la zone pellucide

La fixation du spermatozoïde à la zone pellucide est une étape cruciale dans la fécondation (Töpfer-Petersen *et al.*, 2000). C'est pourquoi, l'évaluation de la capacité des spermatozoïdes à se lier à la zone pellucide peut constituer un indicateur du potentiel de fertilité du spermatozoïde. Cette étape fait intervenir une interaction de type ligand-récepteur entre le spermatozoïde et la zone pellucide et les tests de liaison des spermatozoïdes à la membrane pellucide pourraient permettre de détecter des dommages au niveau moléculaire (Liu *et al.*, 2004).

La capacité de liaison à la zone pellucide peut être évaluée par deux types de tests :

- le premier utilise des ovocytes intacts homologues (c'est-à-dire provenant d'une femelle de même espèce que le mâle), il s'agit du test de fixation à la zone pellucide (Zona Binding Assay = ZBA).
- Le second utilise des ovocytes homologues sectionnés en deux parties, il s'agit du test des demi-zones pellucides (ou Hemi Zona Assay = HZA).

Ces tests nécessitent une grande disponibilité d'ovocytes. Dans l'espèce bovine, les ovocytes peuvent être récupérés à l'abattoir, alors que dans l'espèce canine, ils sont le plus souvent récupérés suite à des ovariectomies ou autopsies. Chez l'homme, les ovocytes destinés à la fécondation *in vitro* mais n'ayant pas été fécondés, des ovocytes prélevés sur des ovaires après ovariectomie ou *post mortem* peuvent être utilisés pour ces tests. Ces ovocytes peuvent être conservés pendant plusieurs semaines dans des solutions salines concentrées (Yanagimachi *et al.*, 1989).

Pour le test ZBA, les ovocytes entiers sont incubés avec les spermatozoïdes d'un individu « test » et d'un individu « contrôle ». Les spermatozoïdes « tests » et les spermatozoïdes « contrôle » sont marqués par des fluorochromes de couleur différente. Les spermatozoïdes fixés à la zone pellucide sont comptés en microscopie à contraste de phase ou en microscopie à fluorescence (Braundmeier *et al.*, 2002). Ce test requiert un grand nombre d'ovocytes (Mayenco-Aguirre et Pérez-Cortés, 1998) en raison des variations liées à l'ovocyte.

Ces variations peuvent être en partie compensées par le test des demi-zones pellucides, pratiqué sur des ovocytes bisséqués par micromanipulation. Chaque partie de l'ovocyte est

incubée séparément soit avec le sperme à tester soit avec le sperme d'un individu « contrôle » dont la fertilité est avérée. Cette technique permet d'utiliser moins d'ovocytes, mais elle requiert du temps et une grande technicité de l'opérateur (Liu *et al.*, 2004).

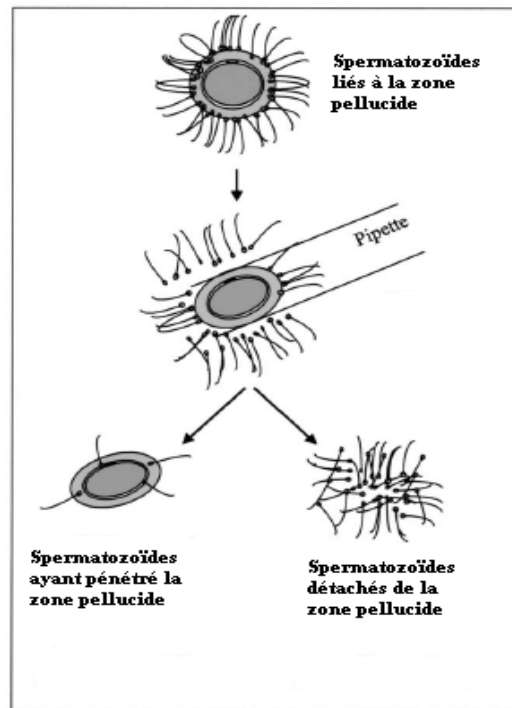
Des études mettent en évidence une corrélation entre le test « Hemi-Zona Assay » (HZA) et les taux de succès de la fécondation *in vitro* chez l'homme (Franken *et al.*, 1993 ; Oehninger *et al.*, 1997) et chez le chien (Mayenco-Aguirre et Pérez-Cortés, 1998). Cependant dans l'espèce bovine, les résultats sont controversés. Fazeli *et al* (1997) ont mis en évidence une corrélation significative entre les tests HZA et les taux de retour en chaleur à 56 jours alors qu'une autre étude n'a pas observé de relation entre la liaison à la zone pellucide et la fertilité des taureaux (Braundmeier *et al.*, 2002).

4.2.4.2 Test de pénétration de l'ovocyte et test de fécondation in vitro

Le test de fécondation *in vitro* permet une évaluation globale de l'aptitude d'un spermatozoïde à féconder un ovocyte, de la fixation à l'ovocyte, sa pénétration, jusqu'au développement d'embryon. Le taux d'ovocytes pénétrés (comprenant le taux d'ovocytes fécondés qui n'ont été pénétrés que par un spermatozoïde et le taux d'ovocytes polyspermiqes), le taux de clivage des ovocytes et du taux de développement embryonnaire après 7 jours de culture peuvent être mesurés.

Chez l'homme, il est difficile de différencier la fixation à la membrane pellucide et la pénétration de la membrane pellucide en raison de la transparence de la zone pellucide. Une nouvelle technique a été mise au point pour évaluer cette étape (Figure 20).

Figure 20 : Technique de suppression des spermatozoïdes liés à la zone pellucide (d'après Liu et al., 2004)



Les ovocytes préalablement mis en contact avec des spermatozoïdes sont aspirés avec une pipette de diamètre légèrement inférieur à celui de l'ovocyte. Ainsi, seuls les spermatozoïdes ayant pénétré dans l'ovocyte restent ancrés dans celui-ci, alors que les spermatozoïdes simplement liés à la zone pellucide sont détachés (Figure 20). Cette méthode est précise et efficace pour évaluer la pénétration des spermatozoïdes (Liu *et al.*, 2004).

Dans l'espèce canine, la fécondation *in vitro* n'est pas maîtrisée (Rijsselaere, 2005). Cependant la particularité spécifique est que les spermatozoïdes canins capités sont capables de pénétrer des ovocytes immatures. La microscopie à fluorescence permet de détecter 98% des spermatozoïdes ayant pénétré l'ovocyte (Hewitt *et al.*, 2001). La technique de pénétration de l'ovocyte est reproductible et corrélée à la mobilité (Rijsselaere, 2005). Cette méthode a été validée pour évaluer l'aptitude à la congélation du sperme dans l'espèce canine.

Chez le taureau, les taux de fécondation *in vitro* sont corrélés à la fertilité *in vivo* évaluée par les taux de non-retour dans l'étude de Marquant-Le Guienne *et al.* (1990). L'étude de Shamsuddin et Larsson (1993) confirme la relation entre la fertilité estimée par l'Insémination Artificielle et la première division cellulaire suivant la fécondation *in vitro*. Cependant,

d'autres études (Schneider *et al.*, 1999) montrent que le taux de division cellulaire après fécondation *in vitro* n'a aucune valeur prédictive de la fertilité *in vivo*. En outre, l'individu constitue une source de variation considérable dans le taux d'ovocytes fécondés et le développement embryonnaire (Shamsuddin et Larsson, 1993). Le test de fécondation *in vitro* semble être une piste intéressante pour prédire la fertilité *in vivo*, cependant, la standardisation et la validation des protocoles est nécessaire avant que ce test soit applicable en routine dans l'espèce bovine.

Les tests de fécondation *in vitro* homologues (ovocyte et sperme appartenant à des individus de même espèce) ne sont pas toujours évidents à réaliser en raison de la faible disponibilité d'ovocytes. C'est pour cette raison que le test de pénétration d'ovocytes d'hamster doré dépellucidés a été développé en 1976 (Yamagimachi *et al.*, 1976). Ces ovocytes dépellucidés peuvent être pénétrés par des spermatozoïdes de n'importe quelle espèce pourvu que ceux-ci aient subi la capacitation et soient capables d'effectuer la réaction acrosomique (Wolf et Sokoloski, 1982). De nombreux procédés de préparation du sperme et d'incubation des spermatozoïdes avec les ovocytes ont été développés. La littérature est divergente quant à la valeur prédictive de ce test de fécondation hétérologue (ESHRE, 1996).

En définitive, les tests d'interaction entre spermatozoïdes et ovocyte sont prometteurs, cependant, ils sont très coûteux et très dépendants des compétences de l'opérateur. De nombreux protocoles ont été développés pour l'ensemble de ces tests et les résultats dépendent des conditions de l'expérience. Une standardisation des procédures est nécessaire afin de valider les résultats obtenus. De plus, la faible disponibilité d'ovocytes limite le développement de ces techniques en routine.

4.2.5 Conclusion

Les tests fonctionnels qui semblent les plus applicables sur le terrain sont les tests d'évaluation de l'état de condensation de la chromatine. L'ensemble des marqueurs fluorescents constitue une perspective intéressante mais les coûts liés à l'utilisation de la cytométrie de flux limitent leur développement. Les tests d'interactions ovocyte-spermatozoïdes nécessitent validation et standardisation avant d'être applicables sur le terrain.

CONCLUSION

Actuellement, on constate une grande similitude des méthodes d'évaluation de la qualité de la semence chez le taureau, le chien et l'homme et peu d'évolution des techniques employées depuis plus de 50 ans. L'examen de la motilité des spermatozoïdes est le test fonctionnel le plus répandu chez les trois espèces considérées.

Chez l'homme, l'examen du sperme est réalisé dans des structures hospitalières, bien souvent dans un contexte pathologique. Les enjeux médicaux sont importants et il convient d'adapter l'examen du sperme au contexte clinique. Les recherches et les avancées technologiques sont nombreuses, certains tests fonctionnels tels que les tests d'évaluation de la structure de la chromatine sont utilisés sur le terrain. La littérature débat de leur intérêt en clinique bien qu'ils permettent d'approfondir la physiopathologie de l'infertilité. Les spécialistes (ESHRE, 1996) s'accordent pour dire que l'ensemble des tests fonctionnels nécessite validation et standardisation avant de pouvoir être utilisés en routine.

Chez les animaux de rente, les avancées technologiques sont dépendantes de la bonne santé économique de la filière. Différents enjeux émergent aujourd'hui dans la filière de l'insémination artificielle bovine, il s'agit notamment de l'amélioration de la fertilité femelle et de la sélection assistée par marqueur. La recherche en andrologie est aujourd'hui tournée vers la détermination de marqueurs corrélés de façon significative à la fertilité. Les recherches appliquées à la filière de l'IA bovine n'ont pas permis pour le moment d'identifier de marqueur fiable car les paramètres étudiés ne sont pas suffisamment corrélés à la fertilité *in vivo*. Néanmoins, la mise en place de la traçabilité des paillettes de semence congelée constitue une avancée considérable qui pourrait avoir d'importantes conséquences à court ou moyen terme.

Dans l'espèce canine, l'examen de la semence a lieu dans des structures universitaires qui tentent de développer l'activité, mais le marché est restreint. Les enjeux dans l'espèce canine concernent essentiellement l'amélioration de la fertilité chez la femelle, la maîtrise des cycles et de la fécondation *in vitro*. Cette filière pourrait cependant bénéficier à l'avenir des avancées technologiques développées chez les autres espèces.

Bibliographie

AMANN, RP.

Can the fertility of a seminal sample be predicted accurately?

Journal of Andrology, 1989, **10**, 89-98.

ANDERSEN, A; GIANAROLI, L, FENBERBAUM, R *et al.*

Assisted Reproductive Technologies in Europ, 2002. Results generated by European registers by ESHRE.

Human Reproduction, 2006, **21**, 1680-1697.

ANDERSEN, A; GIANAROLI, L, NYGREN, K.

Assisted Reproductive Technologies in Europ, 2000. Results generated by European registers by ESHRE.

Human Reproduction, 2004, **19**, 490-503.

ANDERSEN, A; GOOSSENS, V; FERRARETTI, A.P.

Assisted Reproductive Technologies in Europ, 2004. Results generated by European registers by ESHRE.

Human Reproduction, 2008, **23**, 756-771.

ANDRADE-ROCHA, F.

Semen analysis in laboratory practice : An overview of routine tests.

Journal of Laboratory Analysis, 2003, **17**, 247-258.

AUGER, J; EUSTACHE, F.

Standardisation de la classification morphologique des spermatozoïdes humains selon la méthode de David modifiée.

Andrologie, 2000, **10**, 358-373.

AUGER, J ; EUSTACHE, F ; DUCOT, B *et al.*

Intra- and inter-individual variability in human sperm concentration, motility and vitality assessment during a workshop involving ten laboratories.

Human Reproduction, 2000, **15**, 2360-2368.

AUGER, J ; JOUANNET, P.

Manuel de laboratoire de l'OMS, analyse du sperme humain et de l'interaction des spermatozoïdes avec le mucus cervical. 3ième édition.

Paris : Editions INSERM, 1993. 125 p.

BACINOGLU, S; TAŞ, M; CIRIT, Ü *et al.*

The potential fertility estimation capacity of the hypoosmotic swelling test, the thermal stress test and a modified cervical mucus penetration test in the bovine

Animal Reproduction Science, 2008, **104**, 38-46.

BAHR, GF; ZEITLER, E.

Study of bull spermatozoa: Quantitative electron microscopy.

The Journal of Cell Biology, 1964, **21**, 175-189.

BALLACHEY, BE; HOHENBOKEN, WD; EVENSON, DP.

Heterogeneity of sperm nuclear chromatic structure and its relationship to bull fertility.
Biology of Reproduction, 1987, **36**, 915-925.

BARTOLO, A.

Contribution à l'étude de la reproduction chez la chienne: analyse des dossiers des chiennes suivies au Centre d'Etude en Reproduction des Carnivores de l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort de 1999 à 2002.

Th.: Med.vet.:Alfort: 2004; 059. 73 p.

BEARDEN, HJ; FUQUAY, J; WILLARD, S.

Applied animal reproduction. VI^{ième} édition.

New Jersey :Pearson Education, 2004, 427p.

BENECHET, N.

Insémination artificielle en semence congelée dans l'espèce canine : analyse des dossiers des chiennes suivies au centre d'étude en reproduction canine des carnivores de l'ENVA de 2000 à 2005

Th.: Med.vet : Alfort : 2007, 076; 110p.

BISSON, C.

Insémination artificielle canine: premiers résultats nantais.

Th. :Med.vet : Nantes :2002 ; 64. 162 p.

BOITOUT, V.

Insémination artificielle : les résultats nantais de 2001 à 2005.

Th.: Med.vet :Alfort : 2007, 022 ; 212p.

BJÖRND AHL, L; BARRATT, C.L; FRASER, L.R *et al.*

ESHRE basic semen analysis courses 1995-1999: immediate beneficial effects of standardized training.

Human Reproduction, 2002, **17**, 1299-1305.

BRAUN, R.

Packaging paternal chromosomes with protamin.

Nature Genetics, 2001, **28**, 10-12.

BRAUNDMEIER, A; DEMERS, J; SHANKS, R *et al.*

Examination of the Binding Ability of Bovine Spermatozoa to the Zona Pellucida as an Indicator of Fertility.

Journal of Andrology, 2002, **23**, 645-641.

BURKE, T.

Small animal reproduction and infertility. A clinical approach to diagnosis and treatment.

Philadelphia: Lea & Febiger, 1986. 408 p.

CHENG, FP; FAZELI, A; VOORHOUT, WF *et al.*

Use of Peanut Agglutinin to assess the acrosomal status and the zona-pellucida induced reaction in stallion spermatozoa.

Journal of Andrology, 1996, **17**, 674-682.

CHRISTENSEN, P; STRYHN, H; HANSEN, C.

Discrepancies in the determination of sperm concentration using Burker-Turk, Thoma and Makler counting chamber.

Theriogenology, 2005, **63**, 992-1003.

COLLIN, S; SIRARD, MA; DUFOUR, M *et al.*

Sperm calcium levels and chlortetracycline fluorescence patterns are related to the in vivo fertility of cryopreserved bovine semen.

Journal of Andrology, 2000, **21**, 938-943.

CROSS, NL; MEIZEL, S.

Methods for evaluating the acrosomal status of mammalian sperm.

Biology of Reproduction, 1989, **41**, 635-641.

CUPPS, P.T.

Reproduction in domestic animals. Fourth edition.

San Diego: Academic Press, 1991. 670 p.

DAVID, G; BISSON, JP; CZYGLIK, F *et al.*

Anomalies morphologiques du spermatozoïde humain. Propositions pour un système de classification.

Journal de Gynécologie, Obstétrique et Biologie de la Reproduction, 1975, **4**, suppl. I, 17-36.

DAVIS, R.O ; GRAVANCE, C.G ; OVERSTREET, JW.

A standardized test for visual analysis of human sperm morphology.

Fertility and Sterility, 1995, **63**, 1058-1063.

DAVIS, R.O; KATZ, D.F.

Operational standards for CASA instruments.

Journal of Andrology, 1993, **14**, 385-394.

DOUCET, T; VANNIMENUS, C.

Contribution à l'étude de la reproduction chez la chienne: analyse des dossiers des chiennes suivies au Centre d'Etude en Reproduction des Carnivores de l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort de 1994 à 1998.

Th.: Med. Vet.: Alfort: 2001; 038. 98 p.

DUMONT, P.

Appréciation de la fonction sexuelle du taureau reproducteur.

Le Point Vétérinaire, 1997, **28**, 185, 19-32.

ELMORE; RG.

Evaluating bulls for breeding soundness: concentration and motility of semen

Veterinary Medicine, 1985, **80**, 80-84.

ESHRE, ANDROLOGY SPECIAL INTEREST GROUP.

Consensus workshop on advanced diagnostic andrology techniques.

Human Reproduction, 1996, **11**, 1463-1479.

FAZELI, A; ZHANG, B; STEENWEG, W *et al.*

Relationship between sperm-zona pellucida binding assays and the 56-day non return rate of cattle inseminated with frozen-thawed bull semen.

Theriogenology, 1997, **48**, 853-863.

FOOTE, RH.

The history of artificial insemination: selected notes and notables.

Journal of Animal Science, 2002, **80**, 1-10.

FONTBONNE, A.

- Prélèvement et examen de la semence chez le chien.
Encyclopédie Vétérinaire, Paris, Elsevier, 1993, Reproduction 0800, 8 p
- FORESTA, C ; DE CARLO, E ; MIONI, R *et al.*
Sperm nuclear chromatin heterogeneity in infertile subjects.
Andrologia, 1989, **21**, 384-390.
- FRANKEN, D; KRUGER, T; OEHNINGER, S *et al.*
Andrology: the ability of the hemizona assay to predict human fertilisation in different and consecutive in vitro fertilization cycles.
Human Reproduction, 1993, **8**, 1240-1244.
- FRESHMAN, J.L.
Semen collection and evaluation.
Clinical Techniques in Small Animals Practice, 2002, **17**, 104-107
- GARNER, D; JOHNSON, L.
Viability assessment of mammalian sperm using SYBR-14 and Propidium Iodide.
Biology of Reproduction, 1995, **53**, 276-284.
- GONZALES, J.
Histoire du spermatozoïde et mobilité des idées reçues.
Gynécologie Obstétrique et Fertilité, 2006, **34**, 819-826.
- GORDON, I.
Controlled Reproduction in Cattle and Buffaloes.
Wallingford: CAB international, 1996, Volume 1, 500 p.
- GRIZARD, G; JIMENEZ, C.
Les examens du sperme dans l'exploration de la fertilité masculine.
Progrès en Urologie, 1997, **7**, 496-504.
- GUERIN, C.
L'insémination artificielle dans l'espèce canine.
Le Point Vétérinaire, 1997, **28**, 33-42.
- GUERIN, P ; FERRER, M ; FONTBONNE, A *et al.*
In vitro capacitation of dog spermatozoa as assessed by the chlortetracycline staining.
Theriogenology, 1999, **52**, 617-628.
- HEWITT, DA; FLECHER, S; ENGLAND, GCW.
Test of canine sperm function in vitro using primary homologous oocytes with fluorescence and confocal microscopy.
Journal of Reproduction and Fertility, 2001, **57**, 127-136.
- IGUER-OUADA, M; VERSTEGEN, JP.
Evaluation of the "Hamilton-Thorn computer-based automated system" for dog semen analysis.
Theriogenology, 2001, **55**, 733-749.
- JEQUIER, A.
Is quality assurance in semen analysis still really necessary? A clinician's point of view.
Human Reproduction, 2005, **20**, 2039-2042.

- JEYENDRAN, RS; VAN DER VEN, HH; PEREZ-PELAEZ, M *et al.*
Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics.
Journal of Reproduction and Fertility, 1984, **70**, 219-225.
- JOHNSTON, S.D.
Performing a complete canine semen evaluation in a small animal hospital.
Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice, 1991, **21**, 545-551.
- JOUANNET, P; DUCOT, B; FENEUX, D *et al.*
Male factors and the likelihood of pregnancy in infertile couples. I. Study of sperm characteristics.
International Journal of Andrology, 1988, **11**, 379-394.
- KATZ, D; OVERSTREET, J; SAMUELS, S *et al.*
Morphometric analysis of spermatozoa in the assessment of human male fertility.
Journal of Andrology, 1986, **7**, 203-210.
- KENNEDY, S.P; SPITZER, J.C; HOPKINS, F.M *et al.*
Breeding soundness evaluations of 3648 yearling beef bulls using the 1993 Society for Theriogenology guidelines.
Theriogenology, 2002, **58**, 947-961.
- KRUGER, TF; ACOSTA, AA; SIMMONS, KF *et al.*
New methods for evaluating sperm morphology with predictive values for human *In Vitro* Fertilization.
Urology, 1987, **30**, 248-251.
- MAC DONALD'S.
Veterinary endocrinology and reproduction. 5th edition.
Iowa: Pineda, M; Dooley, M. 2003, 597 p.
- MAHMOUD, A.M; DEPOORTER, B; PIENS, N *et al.*
The performance of ten different methods for the estimation of sperm concentration.
Fertility and Sterility, 1997, **68**, 340-345.
- MARNET, B; VIEITIEZ, G; MILHET, P *et al.*
Computer-assisted assessment of sperm morphology : comparison with conventional techniques.
International Journal of Andrology, 2000, **23**, 22-28.
- MARQUANT-LE GUIENNE, B; HUMBLLOT, P; THIBIER, M *et al.*
Evaluation of bull semen fertility by homologous in vitro fecondation tests.
Reproduction, Nutrition, Development, 1990, **30**, 259-266.
- MARSHALL, F.H.A.
Marshall's physiology of reproduction. 4ième edition.
Lamming G.E, 1990, Volume 2, 966 p.
- MARTINS, C; DODE, M; BAO, S *et al.*
The use of the acridine orange test and the tunel assay to assess the integrity of freeze-dried bovine spermatozoa DNA..
Genetics and Molecular Research, 2007, **6**, 94-104.
- MAYENCO- AGUIRRE, A; PEREZ-CORTES, A.

Preliminary results of hemizona assay as fertility test for canine spermatozoa.
Theriogenology, 1998, **50**, 195-204.

MORROW, D.

Current therapy in theriogenology. Diagnosis, treatment and prevention of reproductive diseases in small and large animals.

Philadelphia:W.B Saunders Company,1986, Volume 2, 1143 p.

MORTIMER, ST.

CASA – Practical aspects.

Journal of Andrology, 2000, **21**, 515-524.

NYGREN, K; ANDERSEN, A.

Assisted Reproductive Technologies in Europ, 1998. Results generated by European registers by ESHRE.

Human Reproduction, 2001, **16**, 2459-2471.

OENINGER, S; KOLM, P, MAHONY, M *et al.*

Clinical significance of human sperm-zona pellucida binding.

Fertility and Sterility, 1997, **67**, 1121-1127.

OTTLE, E.

Sperm morphology and fertility in the dog.

Journal of Reproduction and Fertility, 1993, Suppl. **47**, 257-260.

PALMER, C.W; BARTH, A.D.

Comparison of the BullMate™ Sperm Quality Analyser with conventional means of assessing the semen quality and breeding soundness of beef bulls.

Animal Reproduction Science, 2003, **77**, 173-185.

PAREZ, M ; DUPLAN, J.M.

L'insémination artificielle bovine : Reproduction, Amélioration génétique.

Paris :ITEB-UNCEIA, 1987, 256 p.

PASQUALOTTO, FF; SOBREIRO B.P; HALLAK, J *et al.*

Sperm concentration and normal sperm morphology decrease and follicle-stimulating hormone level increases with age.

BJU International, 2005, **96**, 1087-1091.

PEÑA MARTINEZ, A.I.

Canine fresh and cryopreserved semen evaluation.

Animal Reproduction Science, 2004, **82-83**, 209-224.

PONSART, C; GERARD, O; CAPLIN, S.

L'insémination: historique, état des lieux chez l'animal.

Gynécologie, Obstétrique et Fertilité, 2004, **32**, 880-886.

PRATHALINGAM, N.S; HOLT, W.W; REVELL, S.G *et al.*

The precision and accuracy of six different methods to determine sperm concentration.

Journal of Andrology, 2006, **27**, 257-262.

RIJSSELAERE, T.

New techniques for canine semen assessment and characterization of the sperm reservoir in the bitch.

Th: PhD: Department of Reproduction, Obstetrics and Herd Health: Ghent: 2004. 248p.

ROBINSON, JP.

Site :Purdue University Cytometry laboratories (Page consultée le 17 Novembre 2008).[online]

Web : http://www.cyto.purdue.edu/flowcyt/educate/talks/medtech10_99/medtechs99/sld007.htm

ROCHA, A; OLIVEIRA, E; VILHENA, M.J *et al.*

A novel apical midpiece defect in the spermatozoa of a bull without an apparent decrease in motility and fertility: A case study.

Theriogenology, 2006, **66**, 913-922.

ROGERS, B; PARKER, R.

Relationship between the human sperm hypo-osmotic swelling test and sperm penetration assay.

Journal of Andrology, 1991, **12**, 151-158.

ROOT, M.V.

The value of canine semen evaluation for practionners.

Theriogenology, 2007, **68**, 329-337.

ROSTAGNAT, L.

Contribution à l'étude de l'insémination artificielle dans l'espèce canine : analyse des dossiers du Centre d'Etudes et de Recherche en Reproduction et en Elevage des Carnivores.

Th. :Med.Vet. : Lyon : 2003, 025. 146.

SCHNEIDER, C; ELLINGTON, J; WRIGHT, R.

Relationship between bull field fertility and in vitro embryo production using sperm preparation methods with and without somatic cell co-culture.

Theriogenology, 1999, **51**, 1085-1098.

SEAGER, S; PLATZ, C.

Collection and evaluation of canine semen.

Veterinary Clinics of North America, 1977, **7**, 765-773.

SHAMSUDDIN, M; LARSSON, B.

In vitro development of bovine embryos after fertilization using semen from different donors.

Reproduction in Domestic Animals, 1993, **28**, 77-84.

SHWARTZ, D.

Variations physiologiques du sperme.

La Revue du Praticien, 1983, **33**, 3109-3114.

SOUFIR J-C.

L'exploration biochimique du sperme humain.

La Revue du Praticien, 1983, **33**, 1341-1347.

STALHAMMAR, E.M ; JANSON, L ; PHILIPSSON, J.

The impact of sperm motility on non return rate in preselected dairy bulls.

Reproduction, Nutrition and Development, 1994, **34**, 37-45.

SZASZ, F; SIRIVAIDYAPONG, S; CHENG, FP *et al.*

Detection of calcium ionophore induced membrane changes in dog sperm as a simple method to predict cryopreservability of dog semen.

Molecular Reproduction and Development, 2000, **55**, 289-298.

- THIBAUT, C; LEVASSEUR, MC.
La reproduction chez les mammifères et l'homme.
Paris: Editions INRA, 2001, 928p.
- THIBIER, M; WAGNER, HG.
World statistics for artificial insemination in cattle.
Livestock Production Science, 2002, **74**, 203-212.
- TÖPFER-PETERSEN, E; PETROUNKINA, A; EKHLASI-HUNDRIESER, M.
Oocyte-sperm interactions.
Animal Reproduction Science, 2000, **60**, 653-662.
- VAN DER VEN, HH; RAJASINGAM, S; JEYENDRAN, RS; *et al.*
Correlation between human sperm swelling in hypoosmotic medium (hypoosmotic swelling test) and In Vitro Fertilization.
Journal of Andrology, 1986, **7**, 190-196.
- VERSTEGEN, J; IGUER-OUADA, M; ONCLIN, K.
Computer assisted semen analysers in andrology research and veterinary practice.
Theriogenology, 2002, **57**, 149-179.
- VISHWANATH, R.
Artificial insemination: the state of the art.
Theriogenology, 2003, **59**, 571-584.
- WALKER, J.S; WINET, H; FREUND, M.
A comparison of subjective and objective sperm motility evaluation.
Journal of Andrology, 1982, **3**, 184-192.
- WOLF, DP; SOKOLOSKI, JE.
Characterization of the sperm penetration assay.
Journal of Andrology, 1982, **3**, 445-451.
- YANAGIMACHI, R; LOPATA, A; ODOM, CB.
Retention of biologic characteristics of zona pellucida in highly concentrated salt solution: the use of salt-stored eggs for assessing the fertilizing capacity of spermatozoa.
Fertility and Sterility, 1979, **31**, 562-574.
- YANAGIMACHI, R; YANAGIMACHI, H; ROGERS, B.
The use of zona-free animal ova as a test system for the assessment of fertilizing capacity of human spermatozoa.
Biology of Reproduction, 1976, **15**, 471-476.

Toulouse, 2008

NOM : CABANNES

Prénom : CAROLE

TITRE : COMPARAISON DES METHODES D'EVALUATION DE LA QUALITE DE LA SEMENCE DANS LES ESPECES BOVINE, CANINE ET HUMAINE.

RESUME :

L'évaluation de la qualité du sperme est indispensable pour son utilisation en insémination artificielle et dans les techniques de procréation médicalement assistée.

Les enjeux et les finalités de l'examen de la semence sont fondamentalement différents dans les espèces bovine, canine et humaine.

Cette étude décrit et compare les méthodes d'évaluation de la qualité du sperme utilisées en pratique dans des centres spécialisés en France et les critères de conservation et d'élimination de la semence. Enfin, ce travail évalue les limites de ces méthodes et envisage de façon prospective les avancées technologiques, notamment la cytométrie de flux.

MOTS-CLES : SEMENCE, QUALITE, EVALUATION, BOVINE, CANINE, HUMAINE

ENGLISH TITLE : COMPARISON OF METHODS FOR THE ASSESSMENT OF SEMEN QUALITY IN BOVINE, CANINE AND HUMAN SPECIES

ABSTRACT :

Semen quality assessment is necessary in Artificial Insemination and Assisted Reproductive Technologies. Objectives and stakes of semen examination are basically different in bovine, canine and human species.

This study describes the different methods of semen quality assessment in laboratories considered as references in France for the 3 species. This study establishes the similarities and differences in evaluation of semen quality in the different species and compares the criteria for conservation or elimination of an ejaculate in the artificial insemination business. Lastly, this thesis discusses the limits of conventional methods and evocates the technical improvements that could be developed in the future.

KEYWORDS : SEMEN, QUALITY, ASSESSMENT, BOVINE, CANINE, HUMAN