

Institut d'Elevage et de Médecine
Vétérinaire des Pays Tropicaux
10, rue Pierre Curie
94704 MAISONS-ALFORT Cedex

Ecole Nationale Vétérinaire
d'Alfort
7, avenue du Général-de-Gaulle
94704 MAISONS-ALFORT Cedex

Institut National Agronomique
Paris-Grignon
16, rue Claude Bernard
75005 PARIS

Muséum National d'Histoire Naturelle
57, rue Cuvier
75005 PARIS

DIPLOME D'ETUDES SUPERIEURES SPECIALISEES
PRODUCTIONS ANIMALES EN REGIONS CHAUDES

MEMOIRE DE STAGE

ETUDE DE LA COLORATION "EOSINE - BLEU D'ANILINE"
DANS LE CADRE DE L'EVALUATION
DU SPERME PUR DE TAUREAU

par

Gatot CIPTADI

Soutenu publiquement le 29 septembre 1993
devant le jury composé de :

Monsieur F. BADINAND
Monsieur P. DUMONT
Monsieur J. GRUVEL
Monsieur M. THIBIER

année universitaire 1992-1993

**DIPLOME D'ÉTUDES SUPÉRIEURES SPÉCIALISÉES
PRODUCTIONS ANIMALES EN RÉGIONS CHAUDES**

**ÉTUDE DE LA COLORATION "ÉOSINE -
BLEU D'ANILINE" DANS LE CADRE DE
L'ÉVALUATION DU SPERME PUR DE
TAUREAU**

par

Gatot CIPTADI

Lieu du stage: Maison Alfort

**Organisme d'accueil: Laboratoire pour le Contrôle des
Reproducteurs, UNCEIA,
Maison Alfort**

Période du stage : 19 Avril à 31 Août 1993

Rapport présenté oralement le : 29 Septembre 1993.

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je souhaiterais remercier le Directeur du Laboratoire pour le Contrôle des Reproducteurs, Monsieur le Docteur Michel THIBIER, pour son accueil au sein du Laboratoire ainsi que sa gentillesse à mon égard.

En outre, je tiens à remercier mon responsable de stage au laboratoire d'andrologie, Monsieur le Docteur Pascal DUMONT, pour sa grande sympathie, son aide, sa compréhension et sa collaboration tout au long de mon travail, mes rédactions et ainsi que pour son aide dans l'interprétation statistique des données.

De plus, je désirais remercier Madame Françoise GUERIN d'avoir bien voulu travailler avec moi et de m'avoir facilité mon travail.

Je voudrais exprimer mes remerciements envers le Docteur Benoît MERLU, pour sa collaboration et son aide.

Enfin, je souhaite vivement remercier tout le personnel du Laboratoire, en particulier le service de documentation Mademoiselle Isabelle MARTIN et Madame Evelyne GIL ainsi que tous les stagiaires.

SOMMAIRE

	pages
REMERCIEMENTS	
RESUME	1
INTRODUCTION	3
Partie A: PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE	5
I. Les colorants utilisés pour la réalisation de frottis	6
II. La morphologie des spermatozoïdes	9
Partie B: PARTIE EXPERIMENTALE	12
I. Matériel et Méthodes	13
1. Solutions employées	13
2. Réalisation des échantillons	14
3. Etude préliminaire, mise au point de la coloration "éosine-Bleu d'aniline"	14
4. Intégrité membranaire des spermatozoïdes	15
5. Anomalies morphologiques des spermatozoïdes	16
6. Analyse statistique	17
6.1. Intégrité membranaire	17
6.2. Anomalies morphologiques	18
II. Résultats	19
1. Etude préliminaire	19
2. Intégrité membranaire des spermatozoïdes	20
3. Anomalies morphologiques	25
III. Discussion	31
CONCLUSION	36
BIBLIOGRAPHIE	38
ANNEXES	41

R E S U M E

La coloration "éosine-Bleu d'aniline" est utilisée sur du sperme pur de taureau. L'éosine est un colorant vital qui colore en rouge les spermatozoïdes altérés. Le Bleu d'aniline est un colorant de fond qui facilite l'observation des spermatozoïdes rouges ou blancs.

Une mise au point de la coloration sur des critères de confort de lecture et de simplicité de réalisation a conduit à l'adoption de la technique suivante: mélange sur lame de 0,2 μ l de sperme et de 15 μ l de colorant à 1 % d'éosine et 8 % de Bleu d'aniline, étalement avec une lamelle, montage avec du baume.

L'influence de la solution dans laquelle sont dissous les colorants (tampon phosphate ou solution citrate), de la température du matériel (20 ou 37 °C) et de la température de séchage (37 ou 45 °C) a été appréciée sur 6 éjaculats. Les données de coloration ont été soumises à une analyse de variance en tenant compte de l'effet des principaux facteurs, de toutes leurs interactions (doubles, triples et quadruples), et de l'effet des frottis. La moyenne des pourcentages de spermatozoïdes colorés est de 11,9 %. Aucun des 3 facteurs étudiés n'a d'effet significatif. L'éjaculat, l'interaction éjaculat * température du matériel et le frottis ont un effet significatif ($P < 0,001$; $P < 0,01$; $P < 0,001$ respectivement). Les 4 comptages de 100 spermatozoïdes réalisées par frottis sont homogènes entre eux ($P > 0,30$). Il paraît donc judicieux si l'on désire compter 200 spermatozoïdes par éjaculat de réaliser 2 frottis et de compter 100 spermatozoïdes sur chacun d'eux.

L'observation des anomalies morphologiques des spermatozoïdes sur frottis a été ~~ensuite comparée à celle que l'on peut réaliser en phase liquide, en contraste de phase ou en~~

contraste interférentiel, sur les 6 éjaculats déjà utilisés pour les données de coloration. Le contraste interférentiel est la seule technique permettant d'observer les anomalies dites des cratères. Les 2 autres techniques d'observation conduisent d'une manière générale à une erreur par défaut de l'estimation du pourcentage de spermatozoïdes anormaux ($P < 0,001$). L'étalement des frottis augmente artificiellement le pourcentage de têtes détachées.

Le contraste interférentiel confirme ainsi sa supériorité pour l'examen des anomalies, notamment quand il s'agit de comparer entre eux des animaux provenant d'une population assez homogène car issue d'animaux eux-même sélectionnés, comme c'est le cas par exemple dans les taurelleries françaises.

Par contre le frottis "éosine-Bleu d'aniline", ne nécessite pas de matériel d'observation coûteux et permet d'associer l'observation de la coloration et celle des anomalies morphologiques des spermatozoïdes si l'on accepte une légère imprécision dans les estimations.

A ce titre, la technique de coloration "éosine-Bleu d'aniline" est une technique de choix pour tout examen de routine dont l'objectif est simplement d'éliminer les reproducteurs pouvant avoir une fertilité nettement inférieure à la normale et d'autant plus si les moyens financiers pour l'achat du matériel optique sont limités.

Mots clés : bovin, spermatozoïde, coloration, anomalies, Eosine, Bleu d'aniline.

INTRODUCTION

Le programme national d'Indonésie de développement des populations animales et d'amélioration des races locales s'est fondé à partir de 1972 sur l'importation de reproducteurs et la mise en place massive de semences congelées importées. A cela s'est ajouté la création de deux centres d'insémination artificielle à Java, l'un en 1975 et le deuxième en 1982, qui produisent chaque année environ 500 000 doses de semence congelée de taureaux (race Frisonne-Holstein et races locales : Balinais et Madourais) et de buffles. Un programme de testage sur la descendance des reproducteurs a commencé sur les taureaux holsteins achetés et sur les taureaux balinais, cependant à l'heure actuelle l'appréciation de la fonction sexuelle du taureau n'est réalisée qu'à travers la motilité de ses éjaculats. Il est donc urgent de s'intéresser aux autres méthodes d'évaluation de la qualité d'un éjaculat pour la semence produite localement.

L'appréciation qualitative d'un éjaculat, dans le cadre de l'insémination artificielle (I.A.) et quelle que soit l'espèce considérée, repose principalement sur 3 méthodes d'examen : l'observation de la motilité du sperme, la coloration vitale des spermatozoïdes et l'examen des anomalies morphologiques des spermatozoïdes.

Si l'observation de la motilité, sur une goutte de sperme pur, est nécessairement effectuée de façon systématique, le frottis de spermatozoïdes colorés trouve sa place dans l'appréciation de la vitalité et de la morphologie des spermatozoïdes, d'autant plus que le matériel optique nécessaire à l'observation de frottis est des plus simples (microscope à fond clair).

L'intérêt ces deux derniers examens est important dans l'évaluation d'un éjaculat. Il existe en effet une relation très significative entre la fertilité et la proportion de spermatozoïdes colorés (BISHOP et al., 1954; SHAFFER et

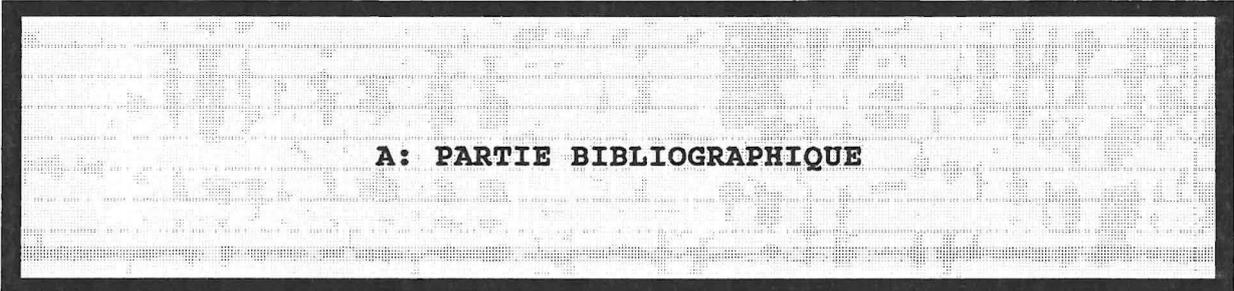
ALMQUIST, 1949). Plusieurs auteurs ont par ailleurs rapporté une association entre une proportion élevée d'anomalies morphologiques du spermatozoïde de taureau et une fertilité détériorée ou un changement pathologique du testicule (WILLIAM, 1921; LAGERLÖF, 1934; ANDERSON, 1945 d'après BISHOP et al, 1954). Il est en outre déjà connu que les éjaculats de certains taureaux stériles contiennent une forte proportion de spermatozoïdes anormaux (HANCOCK, 1949; HANCOCK et ROLLINGSON, 1949).

Dans le cas des pays en voie de développement aux moyens financiers limités et à l'équipement modeste, le recours à l'I.A. et à la sélection des taureaux sur leur fonction sexuelle ne sont pas moins bénéfiques. On peut donc s'interroger sur la valeur des méthodes simples, préconisées il y a plusieurs décennies mais évaluées désormais par des moyens modernes.

L'objectif de notre travail a été de mettre au point une coloration ayant les caractéristiques décrites par ÖETTLÉ (1986):

- donner une bonne définition et un bon contraste des spermatozoïdes,
- permettre de travailler rapidement et facilement, avec un équipement simple,
- ne pas altérer la morphologie des spermatozoïdes.

Une première étape a consisté à mettre au point la technique de coloration et de réalisation du frottis. Puis le pourcentage de spermatozoïdes colorés ainsi que la nature des anomalies observées ont été étudiés.



A: PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

I. LES COLORANTS UTILISES POUR LA REALISATION DES FROTTIS

L'étalement de spermatozoïdes sur frottis, après coloration avec un colorant vital associé un colorant de fond, a été utilisé pour la première fois par LASLEY et al. (1942). Il permet de s'intéresser à la perméabilité membranaire et aux anomalies morphologiques.

Le principe de la coloration vitale est que la différenciation entre les spermatozoïdes non colorés et colorés est dépendante de la différence de perméabilité de leurs membranes cellulaires. Ainsi, les spermatozoïdes altérés ou "morts" sont colorés en rouge, et les spermatozoïdes intègres ou "vivants" restent non colorés (CAMPBELL et al, 1953).

Ces colorations (vitales) ont été développées pour la semence pure, car la dilution dans différents composants comme le jaune d'oeuf (SWANSON et BEARDEN, 1951), les sels, et le glucose (MAYER et al., 1951) pourrait gêner le processus de la coloration vitale.

Le plus utilisé des colorants vitaux est l'éosine, associé à différents colorants de fond. Le sperme pur est alors le plus souvent préalablement dilué dans une solution de colorants tels que : la coloration à l'éosine-nigrosine ou Bleu d'opale (LASLEY et al., 1942 ; CAMPBELL et al. 1956; BLOM, 1950; SWANSON et BEARDEN, 1951; HANCOCK, 1951; BAMBA, 1988), à l'éosine Bleu d'aniline (SHAFFER et ALMQUIST, 1949), à l'éosine B - Fast Green FCH, à l'éosine B ou à l'érythrosine B (MAYER et al., 1951) et des modifications ou des combinaisons des techniques et des colorants (TAMULI et WATSON, 1993). Le tableau 1 résume la composition de différentes colorations utilisées dans la bibliographie.

Tableau 1. Les colorants principaux utilisés pour la semence de taureau.

Préparation	Solution ou composition	Auteurs
Bleu d'Opal	Colorant A: 2 % d'éosine dans tampon phosphate (pH= 7,3) Colorant B: 1 partie Bleu d'Opal 1 partie tampon phosphate (pH= 7,4) Colorant Final(mélange): - 50 % colorant A - 50 % colorant B	LASLEY et al (1942)
Eosine -Bleu d'aniline	- 2 - 5 % aniline - 0,8 - 2,5 % Eosine Y, - 0,8 - 2,5 % Eosine B - pH = 5,6 - 6,4. dans tampon: acide citrique - phosphate disodique ou tampon phosphate Colorant optimum: - 1 % Eosine B - 4 % Bleu d'aniline - 100 ml tampon phosphate pH = 7,2	SHAFFER et ALMQUIST (1949)
Eosine-Nigrosine	Nigrosine (Gurr): 10-30 g Eosine Y(Gurr): 1,67-5 g Tampon/Solution: Eau distillée: 100-300 ml, ou Tampon citrate	CAMPBELL et al. (1956)
	- 30 g Nigrosine (Gurr) 5 g Eosine (Gurr) 300 ml Eau distillée	CAMPBELL et al. (1953)
	5 % Eosine 10 % Nigrosine Solution: Eau distillée	BLOM (1950)
	2-5 % éosine 5-10 % nigrosine Tampon/solution: Citrate ou Eau distillée 0,8 % Eosine 2 % Fast green FCF tampon citrate Colorant Optimum: - 1 g Eosine B - 5 g nigrosine	SWANSON et BEARDEN (1951)

	- 100 ml, de Citrate de sodium à 3 %.	
	D. Eosine Y (Gurr): 5 g 10 % Nigrosine Solution: - 300 ml d'eau distillée pH = 8,5	HANCOCK (1951) BISHOP et al. (1954)
Eosine- Erythrosine Rose Bengal Bleu d'Opal	Tampon phosphate isotonique Eosine Erythrosine Rose Bengal Bleu d'Opal	WARREN et al. (1952)
Eosine Erythrosine Rose Bengal	- Eosine B, Eosine Y Erythrosine B, Rose Bengale Tampon: -1 partie phosphate monosodique -4 parties phosphate disodique pH = 7,35	MAYER et al. (1951)

Beaucoup d'auteurs mettent en garde contre certains facteurs influençant la coloration, et nombreuses études ont été faites pour préciser l'importance des facteurs tels que température (HANCOCK, 1951), temps d'exposition du colorant (CAMPBELL et al., 1956), choix, concentration et composition du colorant, pH et osmolarité (MAYER et al., 1951; BAMBA, 1988).

La proportion de spermatozoïdes colorés augmente en fonction de l'écart de température entre le colorant et le sperme, et d'autant plus si le refroidissement est rapide (LASLEY et al., 1942, HANCOCK 1951, et BISHOP et al. 1954).

Le temps écoulé entre l'éjaculation et la préparation du mélange semence - colorant influence la proportion de spermatozoïdes colorés (DOTT et FOSTER, 1975). De même, le temps d'exposition dans le colorant avant de réaliser le frottis doit être constant (5 minutes, au maximum, HANCOCK, 1951). Quand le temps d'exposition est doublé, la proportion de spermatozoïdes morts augmente d'environ 4 % ($P < 0,01$, CAMPBELL et al., 1956).

II. LA MORPHOLOGIE DES SPERMATOZOÏDES

La détermination des caractères morphologiques du spermatozoïde peut être réalisée en microscopie optique, sur des frottis ou en phase liquide, ou alors en microscopie électronique.

Chaque méthode a ses avantages et ses inconvénients. Par exemple bien que l'examen morphologique du sperme en microscopie électronique soit très approfondi, son utilisation pratique est impossible dans le domaine de l'insémination artificielle pour des raisons de temps d'examen et de coûts.

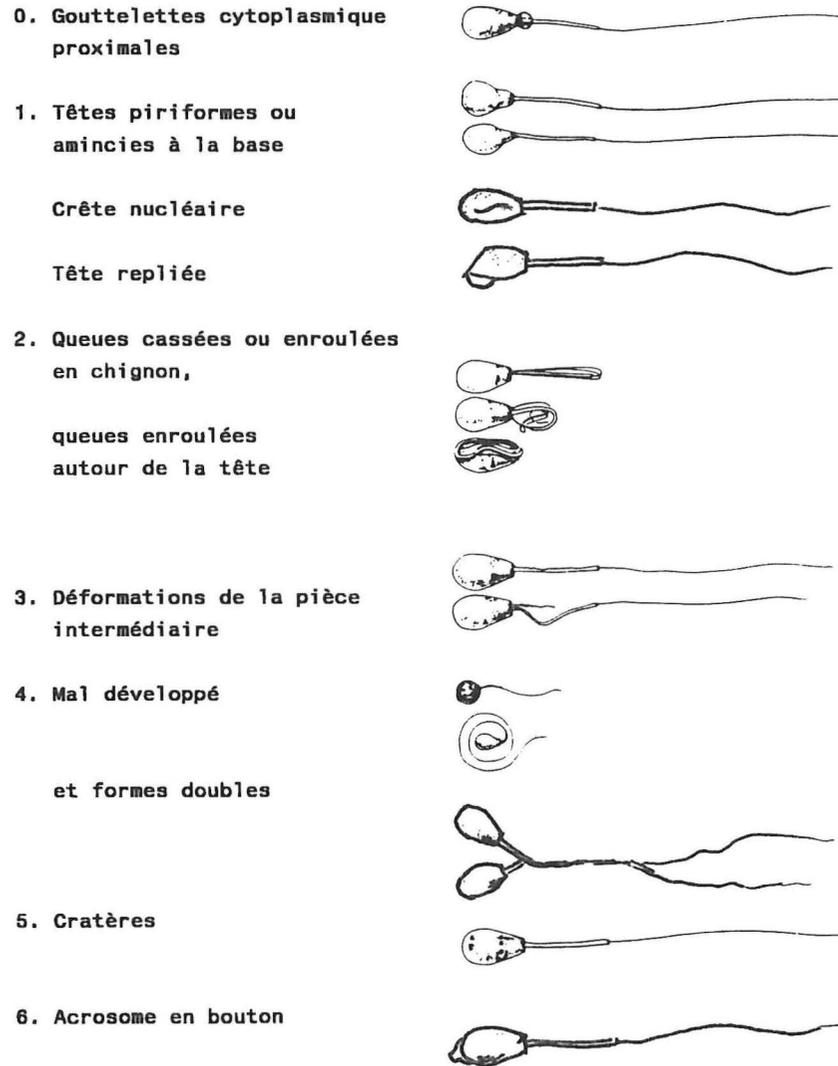
Le frottis est réalisé par étalement de sperme frais mélangé avec un colorant. Il a l'avantage de pouvoir se conserver, de s'interpréter à l'aide de la méthode d'éclairage la plus simple (fond clair, grossissement 400 fois) et pourvu qu'il soit réalisé sans risque de choc thermique, de préciser si l'anomalie s'accompagne ou non de la mort de la cellule. C'est cette technique qui est utilisée pour la plupart des examens de routine au Laboratoire de Contrôle des Reproducteurs (GOFFAUX, 1991).

L'examen des anomalies en phase liquide consiste à examiner les spermatozoïdes entre lame et lamelle, à un fort grossissement nécessitant l'immersion (1000 fois ou davantage) et au contraste de phase, ou, mieux, au contraste interférentiel. Le matériel nécessaire est assez coûteux mais permet une observation très fine des spermatozoïdes.

La classification des anomalies morphologiques par le caractère physique des spermatozoïdes est très variable selon les auteurs. Théoriquement d'après SAACKE (1990), une anomalie se définit par le fait que les spermatozoïdes n'ont pas la capacité de participer à la fécondation, ou s'ils sont capables d'initier la fécondation, celle-ci n'est pas complète ou ne conduit pas au développement d'embryon viable.

En 1973, Blom a suggéré le regroupement des anomalies en majeures et mineures selon leurs conséquences éventuelles sur la fertilité ou leur aptitude à servir de témoin de l'état physiologique du testicule. Cette classification, simplifiée par OTT en 1986, est utilisée légèrement modifiée au Laboratoire de Contrôle des Reproducteurs après ajout des catégories suivantes : crête nucléaire, tête repliée, formes doubles, acrosome en bouton et rupture partielle du cou (figure 1).

Anomalies Majeures des Spermatozoïdes



Anomalies Mineures des Spermatozoïdes

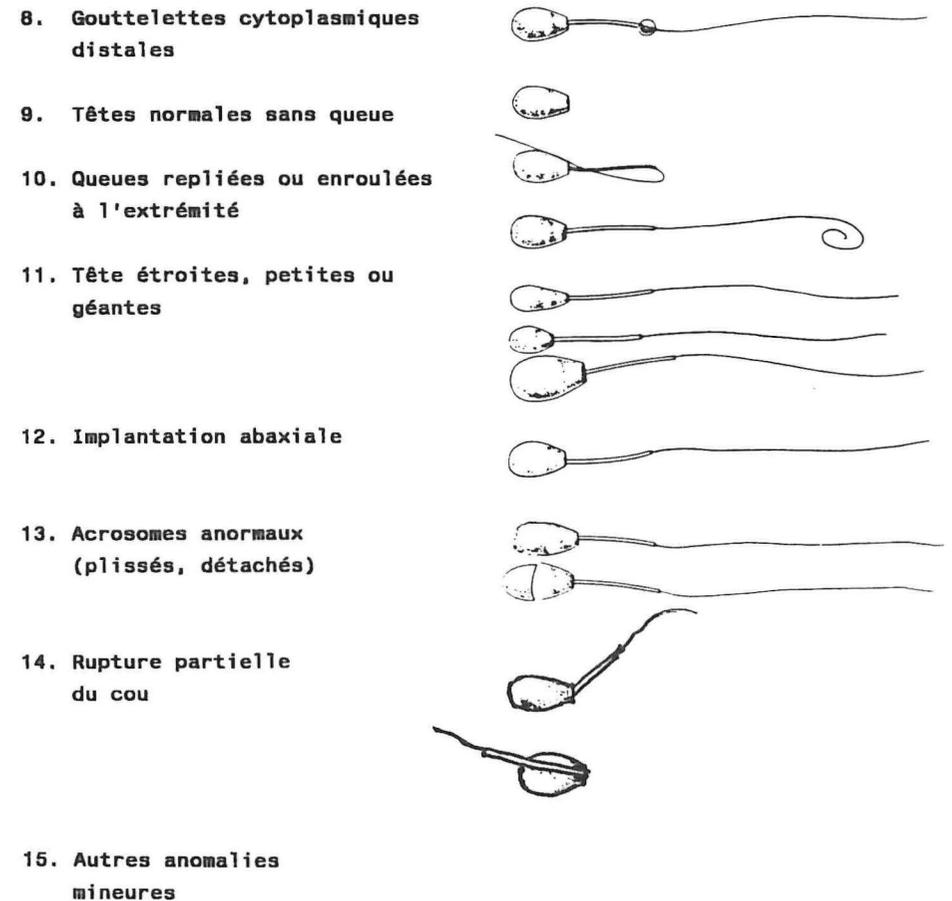


FIGURE 1. Tableau des principales anomalies des spermatozoïdes de taureau classées selon BLOM (1973). D'après OTT (1986). Modifié par DUMONT (1992).

B. PARTIE EXPERIMENTALE

I. MATERIEL ET METHODES

1. Solutions employées

Deux solutions de base ont été employées pour les colorants éosine-Bleu d'aniline, un tampon phosphate "TP" (0,300 g de KH_2PO_4 et 1,503 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ pour 100 ml d'eau distillée, pH = 6,8; 233 mosm/kg) et une solution de citrate trisodique "SC" (2 g de citrate trisodique pour 100 ml d'eau distillée, pH = 8,5; 192 mosm/kg).

A 100 ml de chacune de ces 2 solutions de base (TP ou SC) 1,0 g d'éosine G (Merck no.1345, CI 45380) et 8,0 g de Bleu d'aniline (Gurr, BDH 34003, CI 42755) ont été rajoutés de façon à obtenir 2 colorants, "P" et "C" pour phosphate et citrate respectivement. Le colorant phosphate a été employé pur ou additionné de 2 % d'alcool à 95 %.

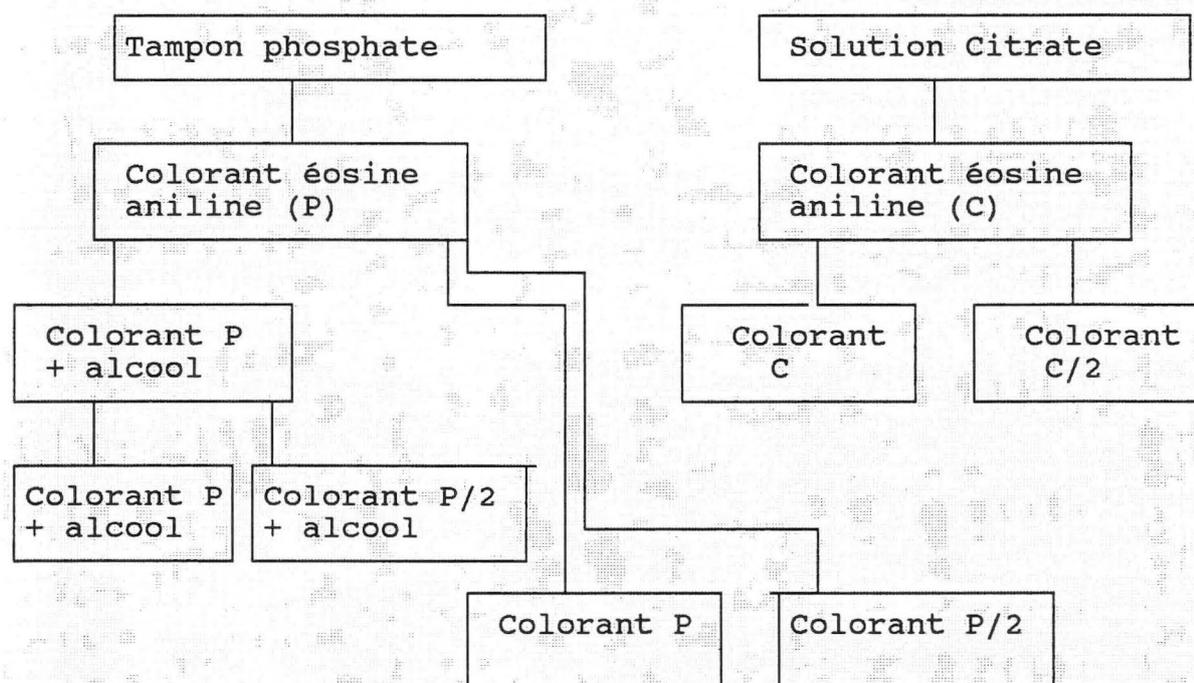


Figure 2 : solutions de colorant réalisées à partir des tampons phosphate et citrate.

Chacun de ces 3 colorants a été employé tel quel ou redilué à moitié dans la solution de base correspondante (Colorants P/2, P/2 + alcool, C/2).

La solution fixatrice pour les examens en phase liquide est constituée de 2 % de glutaraldéhyde dans un tampon PBS (NaCl 8,0 g/l; KCl 0,2 g/l; Na₂HPO₄ (7H₂O) 1,7 g/l; KH₂PO₄ anhydre 0,2 g/l).

2. Réalisation des échantillons

- Frottis éosine-aniline

Immédiatement après la récolte, du sperme pur est mélangé au colorant, étalé sur une lame éventuellement tiédie puis le frottis est mis à sécher sur une plaque thermostatée.

- Fixation en phase liquide

Parallèlement à la réalisation du frottis, 50 µl de sperme pur sont déposés dans 2 ml de la solution fixatrice pour l'examen des anomalies en phase liquide. Les échantillons ont été conservés 2 à 3 jours à 4 °C avant les examens.

3. Etude préliminaire, mise au point de la coloration éosine-Bleu d'aniline.

Cette étude a eu pour but de choisir:

- la technique d'homogénéisation du mélange sperme-colorant
 - * soit sur lame avec le cône de la micropipette ayant servi à prélever le sperme, comme cela est généralement décrit dans la bibliographie (BART et OKO, 1989).
 - * soit par agitation dans un puits de plaque pour test de migration, technique employée au Laboratoire de Contrôle des Reproducteurs pour la coloration éosine nigrosine.
- la technique d'étalement (avec une lamelle 18 x 18 mm ou avec une lame)
- les volumes de sperme et de colorant
- les colorants parmi les 6 solutions réalisées (figure 2).

Trois techniques d'étalement ont été employées, mélange sur lame et étalement avec une lame (LL), mélange sur lame et étalement avec une lamelle (LLm), mélange sur plaque et étalement avec une lamelle (Plaque)

Les critères de choix ont été:

- la simplicité de la réalisation.
- la concentration des spermatozoïdes sur la lame afin de faciliter le comptage (30 à 40 spermatozoïdes/champ au grossissement x 400)
- l'obtention d'un fond bleu foncé permettant un contraste important entre les spermatozoïdes et le fond.
- l'absence d'apparition de cristaux sur le frottis

4. Intégrité membranaire des spermatozoïdes

A partir des essais précédents ont été retenus la technique de mélange et d'étalement lame + lamelle et les colorants Phosphate + alcool et Citrate (à 1 g d'éosine et 8 g de Bleu d'aniline par 100 ml).

Le schéma expérimental a été le suivant :

2 taureaux x 3 éjaculats x 2 colorants (phosphate et citrate) x 2 températures de lame (20 °C et 37 °C) x 2 températures de séchage du frottis (37 et 45 °C) x 2 frottis (répétitions) x 4 comptages de 100 spermatozoïdes (répétitions). La figure 3 illustre les comptages de spermatozoïdes réalisés pour chaque combinaison de traitement EJ.COL.TL.TS.

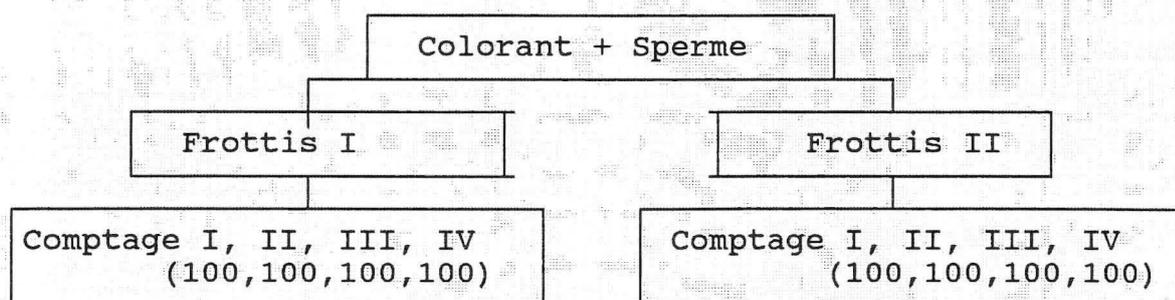


Figure 3 : schéma de la répartition des comptages réalisés pour chaque combinaison de traitement EJ.COL.TL.TS.

Afin d'éviter l'apparition de fins cristaux, les lames ont été montées avec du baume (Eukitt) quelques heures après leur réalisation.

L'observation des spermatozoïdes a été faite au grossissement x 400 en fond clair. Les champs ont été choisis vers le milieu du frottis, 3 champs par comptage de 100 spermatozoïdes. Les champs où les spermatozoïdes étaient trop concentrés et où le fond était trop sombre n'ont pas été observés.

Les spermatozoïdes ont été classés en 2 catégories:

- intègres : non colorés (blanc), et colorés à moitié.
- altérés : colorés en rouge en totalité.

5. Anomalies Morphologiques des spermatozoïdes

Ils s'agissait d'apprécier, par rapport à une technique de référence qui est l'examen des anomalies en phase liquide en microscopie à contraste interférentiel, deux autres techniques d'observation pour lesquelles le matériel optique est moins onéreux:

- l'observation sur frottis "éosine-Bleu d'aniline" en fond clair.
- l'examen en phase liquide en microscopie en contraste de phase.

Les frottis utilisés sont ceux de l'expérience "intégrité membranaire". C'est à dire que pour chacun des 6 éjaculats, 16 frottis ont été exploités (2 colorants x 2 températures de lame x 2 températures de séchage x 2 répétitions). Sur chaque frottis, 200 spermatozoïdes ont été comptés ce qui a conduit à l'observation de 19 200 spermatozoïdes pour la technique des frottis.

Parallèlement deux échantillons de sperme ont été fixés par éjaculat. Pour chaque tube et pour chaque technique en phase liquide, 200 spermatozoïdes ont été examinés (soit 2400 spermatozoïdes au total par technique en phase liquide).

6. Analyse statistique

6.1. Intégrité membranaire

Huit combinaisons de traitements à effets fixes, colorants (COL), températures de lame (TL) et températures de séchage (TS) sont appliquées à 3 éjaculats de 2 taureaux.

Il s'agit surtout d'éprouver les différences entre colorants, températures de lame, température de séchage, ainsi que l'homogénéité des résultats entre comptage et frottis. Aussi, afin de limiter la complexité du modèle, la hiérarchie "taureau - éjaculats" est négligée et les 6 éjaculats sont considérés comme indépendants. Les données de coloration, sans transformation préalable, ont été soumises à une analyse de la variance dont le modèle est une factorielle à 4 facteurs:

$$\begin{aligned}
 X = & \mu + \text{COL} + \text{TL} + \text{TS} + \text{EJ} + \\
 & \text{COL*TL} + \text{COL*TS} + \text{COL*EJ} + \text{TL*TS} + \text{TL*EJ} + \text{TS*EJ} \\
 & + \text{COL*TL*TS} + \text{COL*TL*EJ} + \text{COL*TS*E} + \text{TL*TS*EJ} + \\
 & \text{COL*TL*TS*EJ} + F + \text{EPS}
 \end{aligned}$$

- X est le pourcentage de spermatozoïdes colorés d'un comptage de 100 spermatozoïdes.
- μ est la moyenne des pourcentages de spermatozoïdes colorés
- COL, TL, TS sont des facteurs indépendants à effet fixe,
- l'éjaculat (EJ) est un facteur indépendant à effet aléatoire.
- COL * TL, COL * TS, etc.. sont les effets des interactions doubles, triples ou quadruples.
- F est l'effet frottis (aléatoire) à l'intérieur de chaque combinaison (sous classe) COL.TL.TS.EJ, et
- EPS est l'effet aléatoire du comptage intra frottis.

L'homogénéité du comptage intra frottis est appréciée par le test de "l'homogénéité de la variance de la distribution binomiale" (Annexe 1)

6.2. Anomalies morphologiques

Les résultats de tous les éjaculats ont été fondus et seules les moyennes (réalisées sur 19 200 spermatozoïdes pour les frottis et 2 400 spermatozoïdes pour chacune des 2 techniques en phase liquide) ont été comparées entre elles. Pour chaque catégorie d'anomalie, un χ^2 a été réalisé entre les données du contraste interférentiel et du contraste de phase d'une part, et entre les données du contraste interférentiel et celles des frottis d'autre part.

II. RESULTATS

1. Etude préliminaire

- Volumes de sperme et de colorant à mélanger

Les volumes optimum sont présentés pour chaque technique dans le tableau 2.

Tableau 2. Volumes de sperme et de colorant optimum pour les trois techniques de mélange et d'étalement du sperme.

Technique	Sperme (μ l)	Colorant (μ l)
Lame + Lame	0,5	15
Lame + Lamelle	0,2	15
Plaque	6,0	75

- influence du colorant sur l'aspect de la coloration de fond.

Pour le colorant Phosphate, la présence d'alcool permet un étalement plus homogène et évite la formation de tâches bleues.

La coloration de fond est plus agréable pour les concentrations "mères" que pour les concentrations 1/2.

Les colorants phosphate + alcool et citrate seront retenus pour l'étude suivante.

- technique d'étalement

Peu de différences apparaissent entre les 3 techniques de mélange et d'étalement. La technique Lame + Lamelle sera utilisée par la suite en raison d'une moindre utilisation des consommables, colorant et lame.

Pour tous les colorants apparaissent progressivement (après quelques heures) de fines ponctuations qui sont sans doute des cristaux d'aniline.

2. Intégrité membranaire des spermatozoïdes.

Le pourcentage de spermatozoïdes colorés est en moyenne de 11,9 % sur les 384 comptages de 100 spermatozoïdes.

Il ressort de l'analyse de variance, présentée au tableau 3, que:

- les effets des 3 facteurs étudiés (COL, TL, TS) ne sont pas significatifs (figures : 4, 5 et 6)
- l'éjaculat et l'interaction Ejaculat-Température de lame sont des sources de variation significatives ($P < 0,001$ et $P < 0,01$). Sur les figures 7 et 8, les éjaculats ont été regroupés par taureau.
- le frottis a également un effet significatif ($P < 0,001$). La variance entre frottis, pour une même combinaison EJ.COL.TL.TS, vaut $S^2_f = 4,90$. L'écart type est donc élevé ($S_f = 2,21$) par rapport à la moyenne des frottis 11,9 %. Le C.V. moyen est de 20,29 %.

Les comptages intra frottis sont assez homogènes entre eux ($P > 0,30$).

Tableau 3 : Détails de l'analyse de variance effectuée sur les données de spermatozoïdes colorés, tenant compte de l'influence des principaux facteurs, de leurs interactions, des frottis et des comptages intra-frottis.

Source de variation	D.L.	S.C.E.	C.M.	Source de variation au dénominateur de F	F	P
Variation générale	283	8150,3724	-			
Frottis en vrac	95	4557,6224	47,975			
Comptage intra frottis	288	3547,75	12,319			
Frottis intra sous classe (EJ.COL.TL.TS)	48	1531,075	31,914	Comptage Intra Frottis	2,591	P < 0,001
Ejaculat (EJ)	5		235,98	Frottis Intra Sous Classe	7,394	P < 0,001
Colorant (COL)	1		34,440	COL.EJ	5,481	NS
Température lame (TL)	1		56,273	TL.EJ	< 1,0	NS
Température séchage (TS)	1		32,086	TS.EJ	1,114	NS
COL*TL	1		0,0651	COL.TL.EJ	< 1,0	NS
COL*TS	1		11,003	COL.TS.EJ	< 1,0	NS
TL*TS	1		62,565	TL.TS.EJ	1,378	NS
EJ*COL	5		6,284	Frottis Intra Sous Classe	< 1,0	NS
EJ*TL	5		134,33	Frottis Intra Sous Classe	4,209	p < 0,01
EJ*TS	5		28,305	Frottis Intra Sous Classe	< 1,0	NS
EJ*COL*TL	5		44,084	Frottis Intra Sous Classe	1,381	NS
EJ*COL*TS	5		17,059	Frottis Intra Sous Classe	< 1,0	NS
EJ*TL*TS	5		45,409	Frottis Intra Sous Classe	1,423	NS
COL*TL*TS	1		67,503	COL.TS.EJ	1,650	NS
EJ*COL*TL*TS	5		40,909	Frottis Intra Sous Classe	1,282	NS

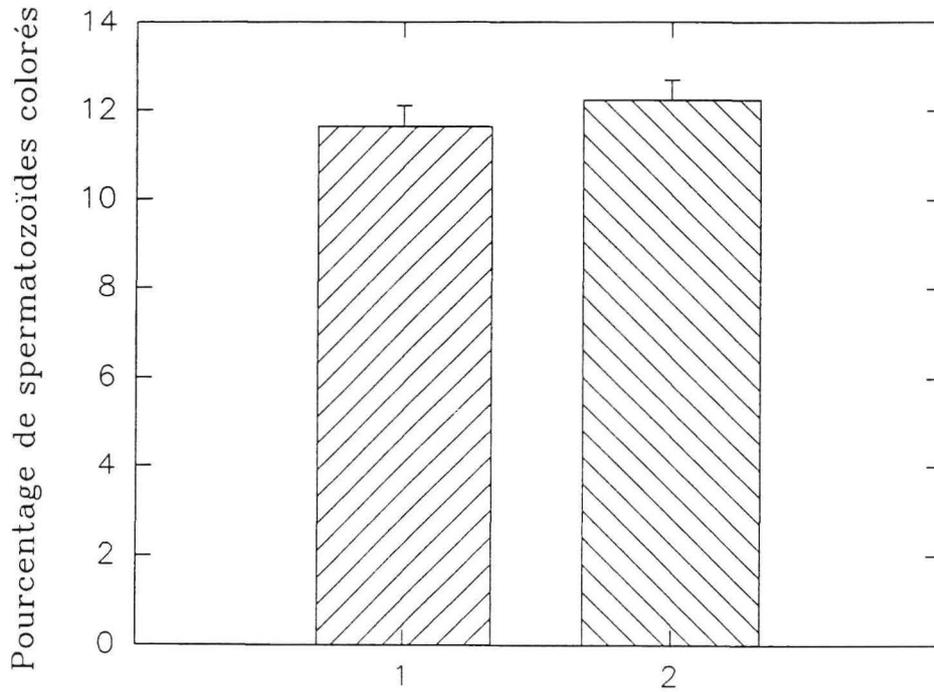


FIGURE 4 : Pourcentage de SPERMATOZOÏDES colorés selon les deux colorants utilisés: Eosine-aniline dans tampon phosphate (1) et dans solution citrate (2), assorti de son intervalle de confiance pour $P = 0,05$.

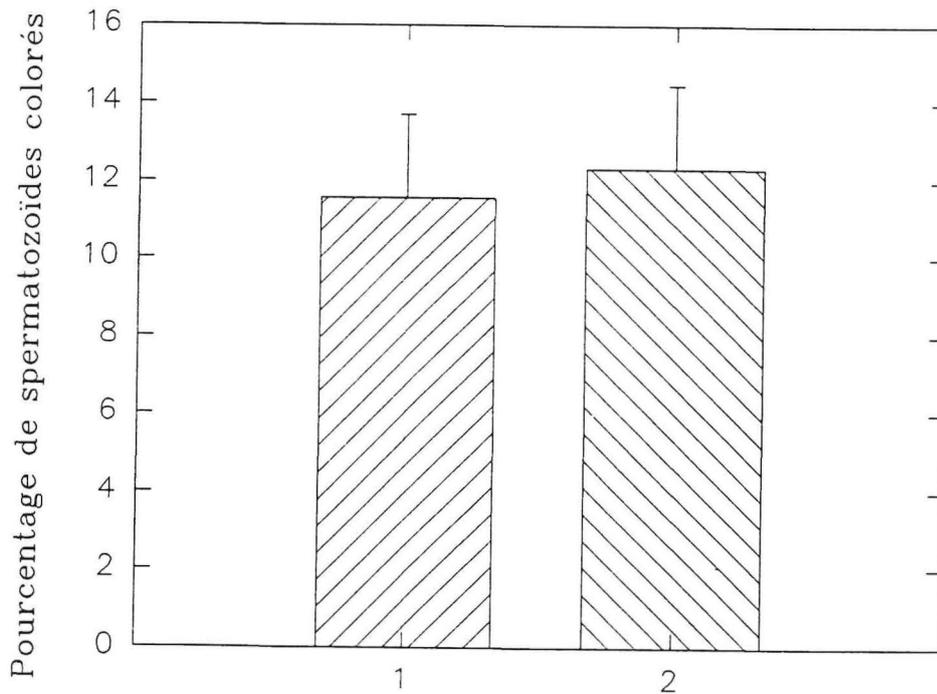


FIGURE 5 : Pourcentage de spermatozoïdes colorés selon les deux températures du matériel, 20 °C (1) et 37 °C (2), assorti de son intervalle de confiance pour $P = 0,05$.

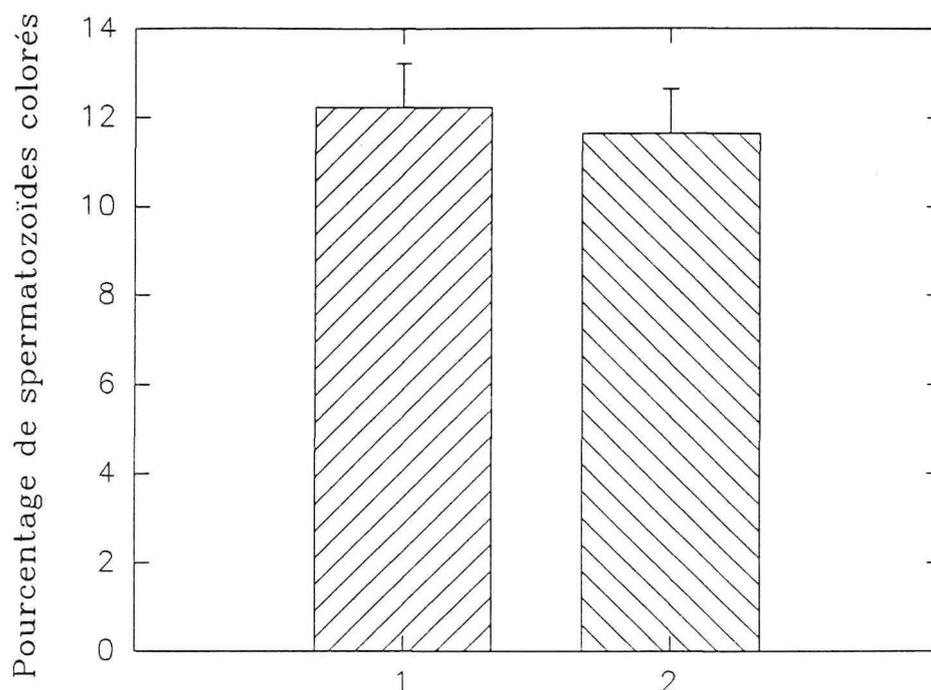


FIGURE 6 : Pourcentage de spermatozoïdes colorés selon les deux température de séchage 37 °C (1) et 45 °C (2), assorti de son intervalle de confiance pour P = 0,05.

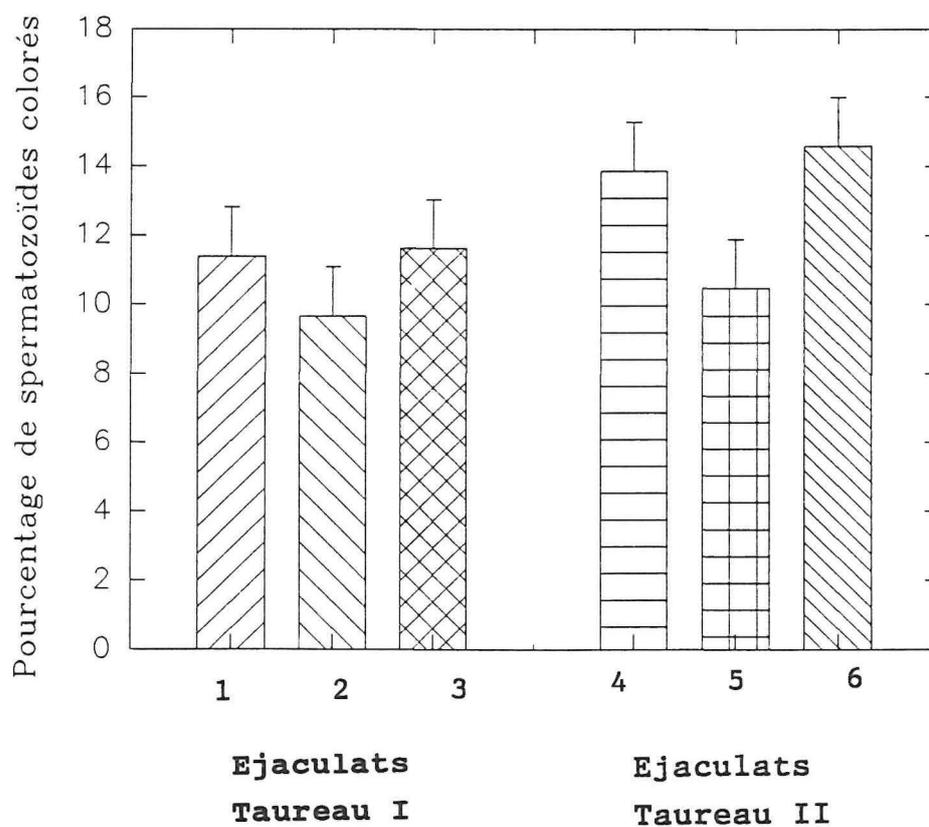


FIGURE 7 : Pourcentage de spermatozoïdes colorés pour les 6 éjaculats étudiés de 2 taureaux. Ejaculats 1, 2, 3 (premier taureau), éjaculats 4, 5, 6 (deuxième taureau), assorti de son intervalle de confiance pour P = 0,05.

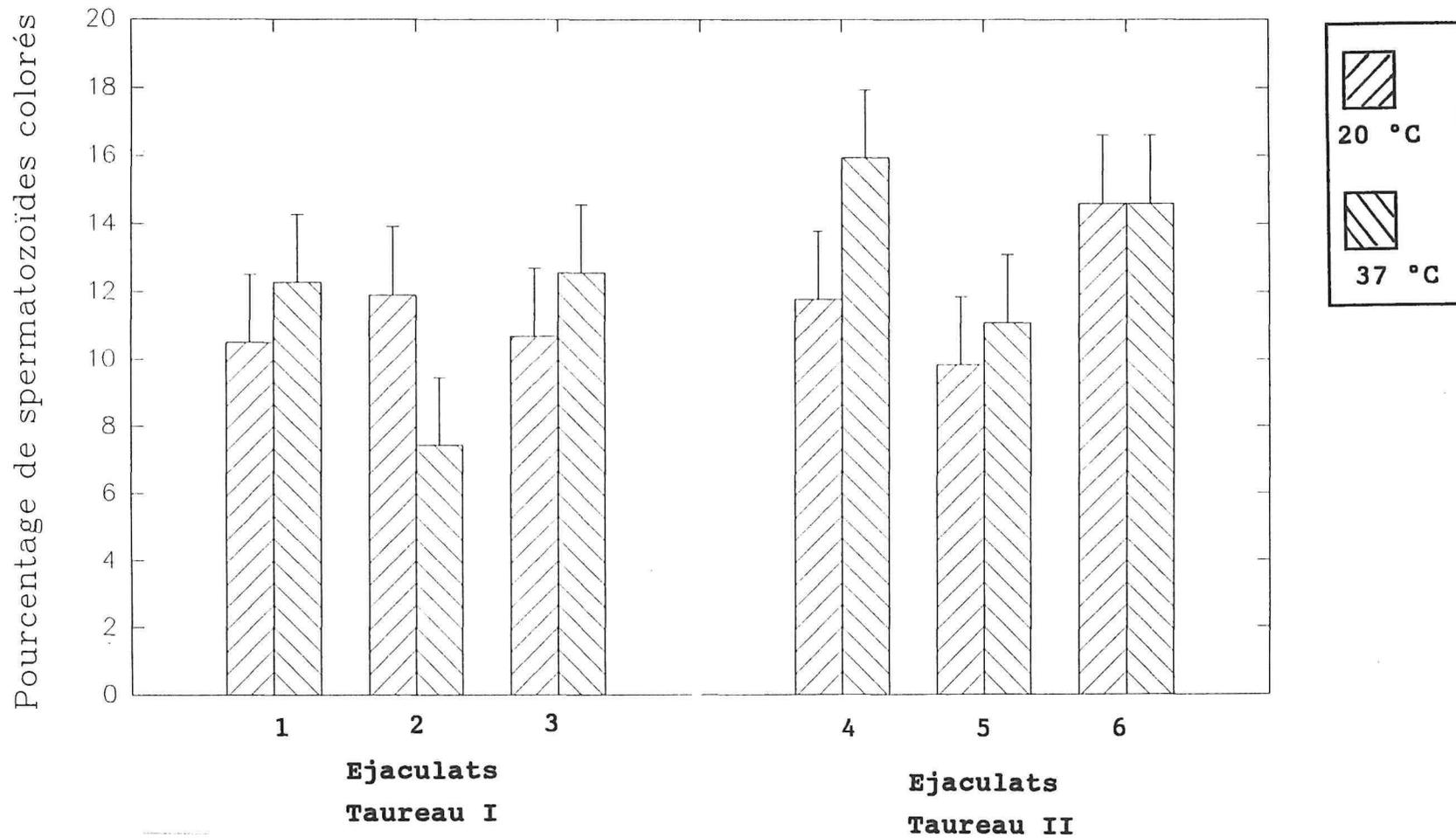


FIGURE 8 : Pourcentage de spermatozoïdes colorés, pour toutes les combinaisons éjaculats (1, 2, 3, 4, 5, 6), et température du matériel (20°C et 37°C), regroupées par taureau (I et II) assorti de son intervalle de confiance pour P = 0,05.

3. Anomalies morphologiques

Un exemple des anomalies observées est présenté sur les figures 9, 10 et 11 pour les techniques d'examen en contraste de phase, contraste interférentiel et frottis.

Les moyennes des spermatozoïdes anormaux et le degré de signification des différences sont présentés dans les tableaux 4 et 5.

Trois catégories d'anomalies n'ont jamais été rencontrées, il s'agit des déformations de la pièce intermédiaire, de l'acrosome en bouton et de l'implantation abaxiale.

La présence de cratères n'a été observée qu'avec le contraste interférentiel (8 spermatozoïdes / 2400 ou 0,33 %).

La probabilité pour que l'observation de spermatozoïdes à cratère soit liée au fait que l'on n'en ait pas rencontré avec les 2 autres techniques est de 10^{-8} , si l'on considère globalement les 3 techniques, et de $3,9 \cdot 10^{-4}$, si l'on ne considère que les deux techniques en phase liquide (Annexe 2).

- Comparaison contraste de phase et contraste interférentiel (tableau 4)

La moyenne du pourcentage des spermatozoïdes anormaux pour les 12 comptages est significativement plus faible en contraste de phase qu'en contraste interférentiel (7,71 vs 10,58 ; $P < 0,001$).

Mise à part pour 2 catégories d'anomalies (les têtes détachées, et les têtes étroites petites ou géantes), le contraste interférentiel a toujours permis de voir plus d'anomalies que le contraste de phase. La différence est significative pour les gouttelettes proximales et distales, les anomalies de tête et les queues repliées, ainsi que pour le regroupement "Total anomalies majeures".

Tableau 4 : Comparaison de la moyenne des spermatozoïdes anormaux (contraste de phase et contraste interférentiel). Les χ^2 entre parenthèses correspondent à la présence d'au moins un effectif calculé inférieur à 5.

	Contraste Interférentiel	Contraste de Phase	χ^2	P <
Anomalie Majeure:				
0	1,00	0,54	3,323	P < 0,10
1	1,04	0,17	15,1	P < 0,001
2	1,21	1,13		N.S.
4	0,25	0,04	(3,655)	
5	0,33	0	(7,93)	
Total Anom. Majeures	3,75	2,5	6,19	P < 0,02
8	1,04	0,29	10,22	P < 0,01
9	1,46	1,75	0,64	N.S.
10	4,08	2,79	6,02	P < 0,02
11	0,42	0,46	N.S.	
13	0,21	0,08	N.S.	
14	0,46	0,42	N.S.	
Total Spz Anormaux	10,58	7,71	11,81	P < 0,001

- comparaison frottis et contraste interférentiel
(tableau 5)

Le pourcentage de spermatozoïdes anormaux et le total des anomalies majeures sont significativement plus faibles pour les frottis ($P < 0,001$). Parmi les 10 catégories d'anomalies (autres que les cratères déjà évoqués) 5 ont une moyenne significativement inférieure pour les frottis. Seule la catégorie des têtes détachées ont une moyenne supérieure pour les frottis ($P < 0,01$).

Tableau 5 : Comparaison de la moyenne des spermatozoïdes anormaux entre frottis et contraste interférentiel.

	Contraste. Interférentiel	Frottis	χ^2	P <
Anomalie Majeures:				
0	1,00	0,23	40,21	P < 0,001
1	1,04	0,49	11,77	P < 0,001
2	1,21	0,73	6,324	P < 0,05
4	0,25	0,38	0,99	N.S.
5	0,33	0,00		
Total Anom. Majeures	3,75	1,83	39,29	P < 0,001
8	1,04	0,12	81,44	P < 0,001
9	1,46	2,35	7,679	P < 0,01
10	4,08	3,00	8,232	P < 0,01
11	0,42	0,68	2,229	P > 0,10
13	0,21	0,04	-	
14	0,46	0,49	0,04	N.S.
Total spz Anormaux	10,58	8,51	11,46	P < 0,001

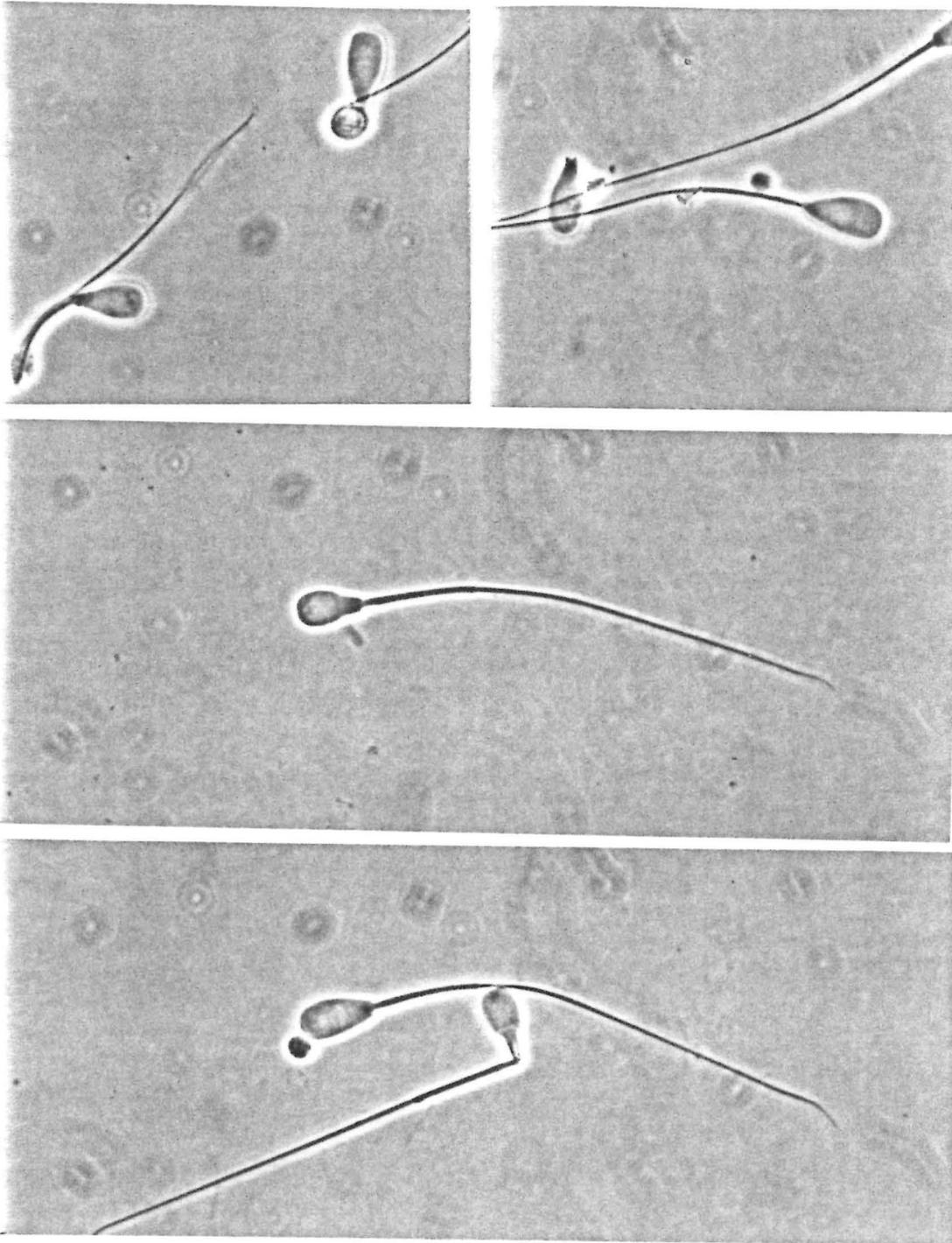


FIGURE 9. Spermatozoïdes de taureau observés en phase liquide en microscopie à contraste de phase, 1000 x. Les catégories de spermatozoïdes sont les suivantes : Queue repliée avec gouttelette cytoplasmique distale, et Queue enroulée en chignon (A), Tête normale sans queue (B), Tête piriforme (C), Rupture partielle de cou et Tête piriforme (D).

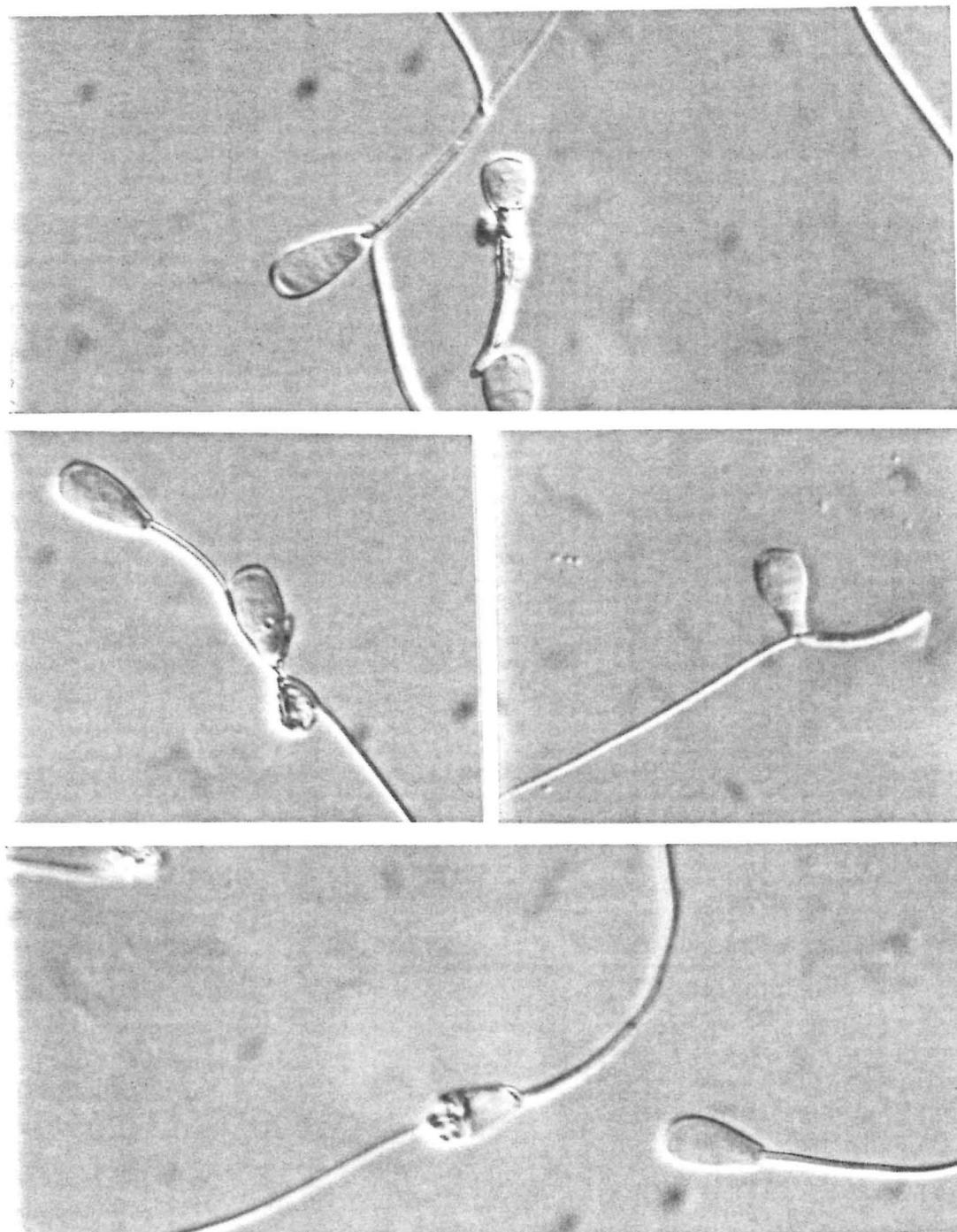


FIGURE 10. Spermatozoïdes de taureau observés en phase liquide en microscopie à contraste interférentiel, 1000 x. Les catégories de spermatozoïdes sont les suivantes : Queue cassée avec Tête piriforme (A), Queue enroulée en chignon et Tête avec cratère (B), Queue repliée et cassée (C), Vacuoles nucléaires (D).

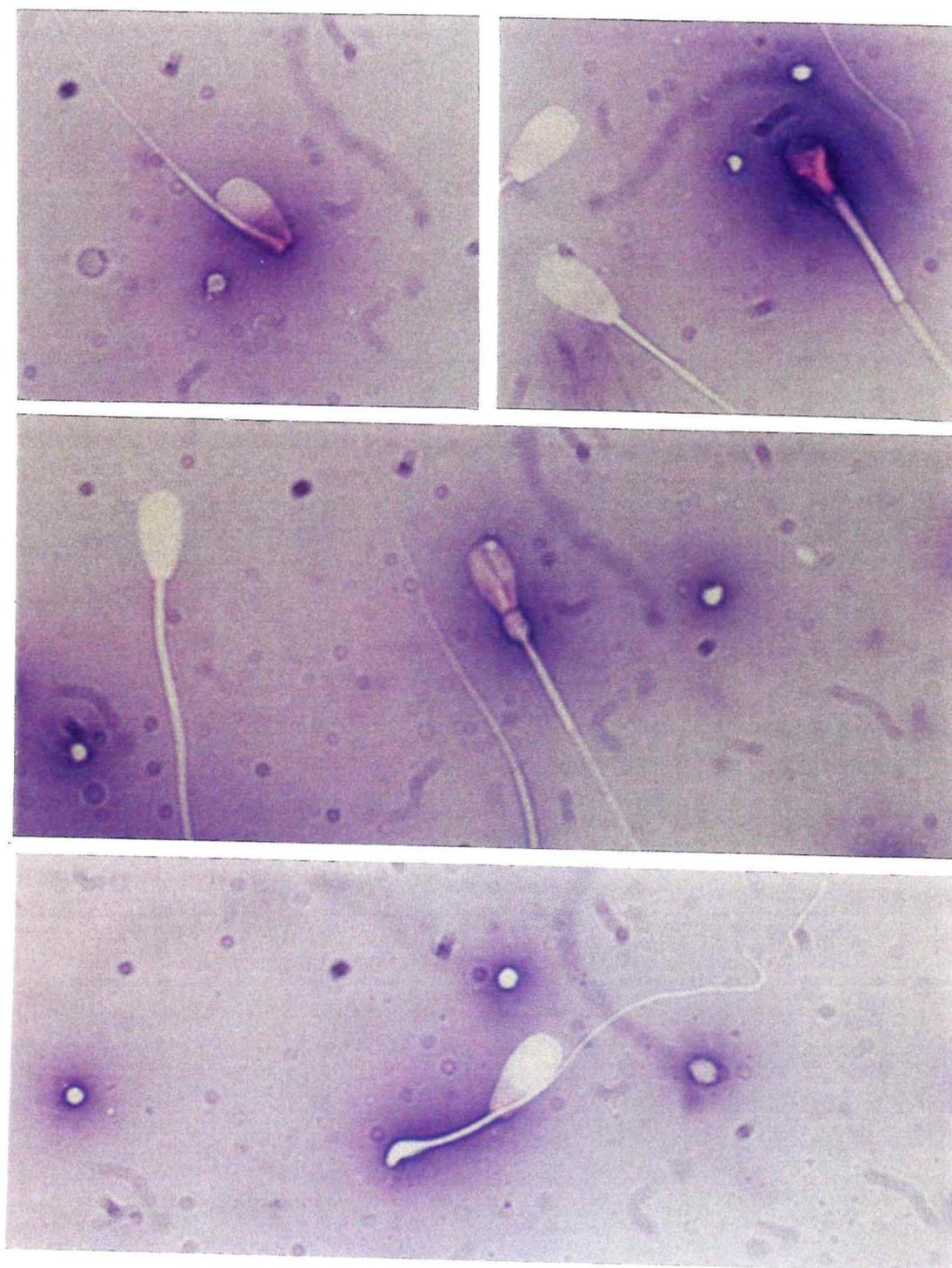


FIGURE 11. Spermatozoïdes de taureau observés sur frottis "Eosine-Bleu d'aniline" en fond clair, 1000 x. Les spermatozoïdes altérés sont colorés en rouge en totalité et les spermatozoïdes intègres sont non colorés (blanc) ou colorés à moitié en rouge. Les catégories de spermatozoïdes sont les suivantes : Rupture partielle du cou, spermatozoïde coloré partiel (A), Mal développé, spermatozoïde coloré (B), Crête nucléaire et Gouttelette cytoplasmique proximale, spermatozoïde coloré (C), Queue repliée, spermatozoïde non coloré (D).

III. DISCUSSION

La démarche consistant à mettre au point une coloration sur des critères de confort de lecture et de simplicité d'exécution était nécessairement subjective, d'autant plus que peu de différences importantes sont apparues entre les différentes options possibles. Ceci permet de comprendre que la technique de coloration vitale avec un colorant de fond soit utilisée avec satisfaction sous une multitude de formes selon les auteurs. Néanmoins comme le soulignent HANCOCK (1951) et CAMPBELL et al. (1956) à propos de la coloration éosine-nigrosine, la précision de l'estimation de la qualité de la semence ou l'évaluation du taux de fertilité d'un taureau, par le pourcentage de spermatozoïdes colorés et non colorés, sera réduite si les conditions de travail, notamment le temps de préparation et la température de la coloration ne sont pas bien contrôlés.

En ce qui concerne la rigueur adoptée sur les volumes de sperme et de colorant pour ce travail expérimental, elle n'est sans doute pas indispensable dans le cadre d'une utilisation de routine d'autant plus qu'elle exige la possession de micropipettes de précision.

La décision d'adopter le montage des lames avec un baume (Eukitt) a amélioré considérablement les conditions optiques et a évité la formation de cristaux. Toutefois on pourra regretter le caractère contraignant du montage dans le cadre d'une technique de routine.

Le pourcentage de spermatozoïdes colorés trouvé sur les 6 éjaculats (en moyenne de 11,9 %) est assez faible, et voisin de ceux trouvés par SEKONI et al (1981, 11,8 %). D'autres auteurs rapportent des pourcentages plus élevés, 25,6 % pour CAMPBELL et al (1956), et 44 à 60 % pour SWANSON et BEARDEN (1951).

Le faible pourcentage de notre étude provient sans doute du fait que les taureaux utilisés étaient des animaux de 4 ans en service dans un Centre d'Insémination Artificielle et donc avaient été sélectionnés sur leur qualité de semence. De plus les spermatozoïdes partiellement colorés que l'on rencontre en général avec ce genre de coloration (CAMPBELL et al., 1956; DOTT, 1956, AALSETH et SAACKE, 1986), ont été rangés dans notre étude parmi les spermatozoïdes intègres, puisque selon HANCOCK (1959), ils pourraient correspondre à des spermatozoïdes altérés par les manipulations lors de la coloration.

Aucun des effets principaux étudiés (colorant, température de lame, température de séchage) ne sont significatifs sur le pourcentage de spermatozoïdes colorés.

Concernant l'effet du colorant, une simplification du modèle en éliminant les interactions pour lesquelles le F est inférieur à 1 ne change rien quant à l'absence de signification de la différence entre les moyennes. On observe toutefois une tendance: moins de spermatozoïdes colorés sont vus avec le colorant tampon phosphate.

Le colorant tampon phosphate + alcool est celui utilisé par VAN DER SCHAAF (1952) et est très proche de celui de SHAFFER et ALMQUIST (1949) qui emploie un mélange de 1 % d'éosine B avec 4 % de Bleu d'aniline dans un tampon phosphate.

Les deux températures de lame 20 et 37 °C avaient été choisies pour simuler soit un travail à température ambiante (en été, donc $t \geq 20$ °C) soit une utilisation d'une platine chauffante à 37 °C, appareil nécessaire à l'observation de la motilité des spermatozoïdes et donc présent dans tout laboratoire de centre d'Insémination Artificielle.

Il ne semble donc pas utile de préchauffer le matériel, au moins en été, car il n'est pas possible de préjuger des conséquences sur le pourcentage de spermatozoïdes colorés d'une température ambiante "hivernale". En effet le refroidissement très brutal du sperme (comme il peut l'être pour un volume aussi faible que 0,2 μ l posé sur une lame de

verre) doit être dommageable pour les spermatozoïdes à partir de températures voisines de 15 °C (KNIGHT et al, 1949; WALES et WHITE, 1960; cités par JONDET 1980).

L'écart entre les deux températures de séchage (37 °C et 45 °C) est assez faible. L'objectif était de comparer un séchage à 37 °C, température facile à obtenir pour les raisons déjà évoquées, avec un séchage plus rapide susceptible de "fixer" la coloration comme cela est généralement conseillé. Un essai de séchage des frottis entre 50 et 60 °C (sur une platine non thermostatée) suivi du montage à l'Eukitt avait entraîné une coloration de tous les spermatozoïdes, c'est pourquoi la température de 45 °C a été choisie.

S'il est classique et rassurant quant au pouvoir discriminant de la coloration, d'observer un effet significatif de l'éjaculat ($P < 0,001$), il est plus inattendu d'observer une interaction éjaculat - température de lame ($P < 0,01$). Aucune explication n'est envisagée, si ce n'est éventuellement de penser que parmi toutes les interactions envisagées il n'est peut être pas complètement anormal d'en avoir trouvée une, par hasard, significative.

L'homogénéité du pourcentage de spermatozoïdes colorés entre frottis et intra frottis, est rapportée par beaucoup d'auteurs comme étant assez médiocre (CAMPBELL et al., 1953, CAMPBELL et al., 1956) et d'autant plus que le nombre de spermatozoïdes comptés est faible (loi binomiale). Dans notre étude, la technique de mélange sur lame et d'étalement avec lamelle est satisfaisante puisque l'homogénéité intra frottis est aussi bonne que possible compte tenu du nombre de spermatozoïdes comptés. Par contre le frottis est une source de variation significative. Aussi pouvons nous faire nôtres les recommandations de CAMPBELL et al. (1956) ou LASLEY et al. (1942), qui sont de réaliser systématiquement 2 frottis et, si l'on ne désire compter que 200 spermatozoïdes par éjaculat, de compter 100 spermatozoïdes sur chacun des frottis.

Concernant les anomalies morphologiques des spermatozoïdes observées sur frottis, en contraste de phase ou en contraste interférentiel, il s'agissait de voir si les 3 techniques étaient également performantes et si les frottis n'induisaient pas d'artefact suite à l'étalement. C'est pourquoi l'effet taureau et la répétabilité du taureau à travers ses éjaculats n'ont pas été étudiés, d'autant plus que ces effets ont déjà été largement démontrés par différents auteurs (LABESSE, 1986, LABESSE et al., 1987; TOURNEUR, 1981; THIBIER, 1991).

Le pourcentage de spermatozoïdes anormaux (7,7 à 10,6 % selon les techniques) est normal pour des taureaux âgés de 4 ans (SÖDERQUIST et al., 1992) et de bonne fécondance (MORSTIN et COUROT, 1974).

Le contraste interférentiel qui est la technique de référence du LCR est effectivement la meilleure technique d'examen. C'est la technique qui permet de mieux voir les anomalies d'une manière générale, et la seule qui permet d'apercevoir les cratères. Les cratères ou vacuoles nucléaires correspondent à une perte de matériel nucléaire plus ou moins importante, située le plus souvent après le bourrelet apical de l'acrosome ou sur le segment équatorial, et de grande conséquence sur la fertilité (BARTH et OKO, 1989).

Cette anomalie est assez insidieuse car elle passe facilement inaperçu à l'observation et peut survenir en très forte proportion sur un éjaculat bien concentré, de bonne motilité et dont les spermatozoïdes survivent bien à la congélation (MILLER et al., 1982). BARTH et OKO (1989) disent observer les cratères en contraste de phase, mais ces auteurs ne précisent pas s'il s'agit de larges cratères, appelés aussi vacuoles nucléaires, ou s'ils comprennent également les cratères très fins.

La technique du contraste de phase et celle des frottis sont des modes d'observation plus abordable financièrement, mais elles entraînent une légère erreur par défaut de l'appréciation des anomalies.

L'observation en contraste de phase ne peut altérer la morphologie des Spermatozoïdes, fixés en phase liquide. Par contre l'altération des spermatozoïdes que l'on pouvait craindre lors de l'étalement du frottis se produit effectivement puisque davantage de têtes détachées sont retrouvées sur les frottis ($P < 0,01$).

CONCLUSION

Le présent travail a permis de préciser les paramètres d'une coloration destinée à être utilisée en routine:

- colorant 1 % éosine, 8 % Bleu d'aniline + alcool dans tampon phosphate
- matériel préchauffé à 37 °C
- mélange sur lame de 0,2 μ l de sperme et 15 μ l de colorant
- étalement avec une lamelle
- séchage à 37 °C
- montage de la lame si observation différée de plus de 24 heures.

Le frottis ainsi obtenu permet, en plus de la coloration, d'examiner la morphologie des spermatozoïdes et se suffit du système optique le plus simple (fond clair).

Toutes les catégories d'anomalies sont distinguées, à l'exception des cratères, et le repérage des anomalies est convenable dans la mesure où l'on accepte une légère erreur par défaut du nombre de spermatozoïdes anormaux (1/5 des spermatozoïdes anormaux ne sont pas vus) et où l'on tolère d'accentuer artificiellement le nombre de têtes détachées (1 unité de pourcentage).

L'examen des anomalies en phase liquide en contraste interférentiel constitue la technique de référence par la grande acuité de diagnostic des anomalies qu'elle permet, et doit être nécessairement employée pour sélectionner des taureaux parmi une population relativement homogène, comme c'est le cas pour les taurelleries françaises. En effet les taureaux français sont issus de stations dans lesquelles un contrôle de fonction sexuelle s'est mise en place à la fin des années 60 (PAREZ et THIBIER, 1983), et l'héritabilité élevée des anomalies (de 0,31 à 0,81 selon les anomalies; THIBIER et COLCHEN-BOURLAND, 1972; CHANDLER et al., 1985) explique l'amélioration de la moyenne de la population pour ce critère et justifie l'utilisation du meilleur matériel pour poursuivre l'effort de sélection.

A l'opposé, si le frottis coloré ne peut prétendre être un moyen d'examen optimal pour les raisons sus évoquées, ses qualités de simplicité, quant à sa réalisation et son examen, en font une technique de choix dès que les objectifs de dépistage d'anomalies sont moins ambitieux. Tel est le cas pour tout examen destiné au dépistage rapide d'animaux produisant une proportion trop élevée de spermatozoïdes anormaux ou destiné à servir de signal d'alarme pour une éventuelle infection génitale. De même les pays ne disposant pas de matériel optique sophistiqué ou dont la population de taureau n'a pas encore été sélectionnée sur des critères de morphologie des spermatozoïdes pourront utiliser avec satisfaction la technique de coloration éosine-Bleu d'aniline.

BIBLIOGRAPHIE

- AALSETH, E.P. and R.G. SAACKE, 1986. Vital Staining and Acrosomal Evaluation of Bovine Sperm. *Gamete Res.* 15 :73 - 81.
- ANDERSON, J. 1945. *The semen of animals and its Use of Artificial Insemination.* Imperial Bureau of Animal Breeding and Genetics, Aberystwyth.
- BAMBA, K. 1988. Evaluation of Acrosomal Integrity of Boar Spermatozoa by Bright Field Microscopy using An Eosine-Nigrosin Stain. *Theriogenology.* June 1988. Vol. 29. No. 6 : 1245 - 1251.
- BARTH, A.D. and R.J., OKO. 1989. *Abnormal Morphology of Bovine Spermatozoa.* Iowa State University Press/Ames, First edition, 1989. 285 p.
- BISHOP, M.W.H., R.C., CAMBELL, J.L, HANCOCK, and A., WALTON,. 1954. Semen Characteristics and Fertility in The Bull. *J. Agric. Sci. Camb.* 44 : 227.- 248
- BLOM, E. 1950. A One Minute Live-Dead Sperm Stain by Means of Eosin-Nigrosin. *Fertility and Sterility.* Vol. 1. No. 2., 1950: 176 - 177.
- BLOM, E. 1973. Ultrastrukturen af nogle karakteristiske spermiedefekter og forslag til et nyt klassificerings system for tyrens Spermioqram. *Nord. Vet. Med.* 25: 383
- CAMPBELL, R.C., J.L., HANCOCK and L., ROTHSCHILD. 1953. Counting Live and Dead Bull Spermatozoa. *J. of Experimental Biology,* Vol. 30: 44 - 49
- CAMPBELL, R.C., H.M., DOTT and T.D., GLOVER. 1956. Nigrosin Eosine as a Stain for Differentiating Live and Dead Spermatozoa. *J. of Agricultural Science* Vol. 48 (1): 1 - 8
- CHANDLER, J.E., R.W., ADKINSON, G.M., HAY and R.L., CRAIN. 1985. Environmental and Genetic sources of variation for seminal quality in nature Holstein bulls. *J. Dairy Sci.* 68: 1270 - 1279.
- DOTT, H.M and G.C., FOSTER, 1975. Preservation of differential Staining of Spermatozoa by Formol Citrate. *J. Reprod. Fert.* (1975) 45; 57 - 60.
- GOFFAUX, M. 1991. L'Examen Approfondi des Anomalies Morphologiques de La Semence du Taureau. *El. et Ins.*1991., 244: 3 - 14.
- HANCOCK, J.L. 1949. Evidence of an inherited seminal character associated with infertility of Friesian bulls. *Vet. Rec.* 61: 308.
- HANCOCK, J.L. and D.H.L., ROLLINGSON. 1949. A Seminal defect associated with sterility oh Guernsey bulls. *Vet. Rec.* 61: 742 - 743.

HANCOCK, J.L. 1951. A Staining Technique for the Study of Temperature Shock in Semen (Abstract). *Nature* No. 4243 (February 24, 1951): 323 - 234

HANCOCK, J.L. 1959. The morphologic Characteristics of Spermatozoa and Fertility. *Inter. J. Fert.* Vol. 4 : 347 - 359

JONDET, R. 1980. Contribution à l'amélioration de la Technologie du sperme de taureau. *These Docteur ès Sciences, Université de Rennes.* p. 166

KNIGHT, C.W., T.E., PATRICK, C., BRANTON. 1949. Unpublished results. *Louisiana Agric. Exp. Sta.* Cités par SALISBURY et VAN DEMARK. 389.

LABESSE, S. 1986. Analyse des données de contrôle de la fonction sexuelle chez le jeune taurillon normand. *Mémoire d'Ingénieur Esitpa, Maison Alfort, 1986, 66.*

LABESSE, S., P., HUMBLLOT, J.L., GUERIN, J., GAILLARD, P.L., GASTINEL, J.J., COLLEAU, M., THIBIER. 1987. Analyse des données de contrôle de la fonction sexuelle chez le taurillon normand. Relation entre niveaux de croissance et caractéristiques séminales. *Elev. et Insémination, 1987, 218, 11 - 20.*

LAGERLÖF, M. 1934. *Acta path. microbiol.Scand.(suppl.) 19.*

LASLEY, J.F., G.T., EASLEY and F.F., Mc. KENZIE. 1942. A Staining Method for The Differentiation of Live and Dead Spermatozoa. I. Applicability To The Staining of Ram Spermatozoa. *Anat. rec.* 82 : 167.

MAYER, D.T., C.D., SQUIER, R., BOGART and M.M., OLOUFA. 1951. The Technique for Characterizing mammalian Spermatozoa as Dead of Living by Differential Staining. *J. Animal Sci.* No.10 : 226 - 234.

MILLER, D.M., F., HRUDKA, W.F., CATES, and R.J., MAPLETOFT. 1982. Infertility in a bull with a nuclear sperm defect: A case report. *Theriogenology* 17: 611 - 621.

MORSTIN, F.J. et M., COUROT. 1974. Ultrastructure des spermatozoïdes de taureaux de différente Fécondance. Morphologie ultrastructurale, Glycoprotéines acrosomiques et Membranaires, Charges négatives de surface. *Ann. Biol.Anim. Bioch.Biophys., 1974, 14 (4-A), 581 - 590.*

OETTLE, E.E.. 1986. Using A New Acrosome Stain To Evaluate Sperm Morphology. *Veterinary Medicine/ March 1986: 263-266.*

PERRIN, M.J. 1976. Relation entre morphologie anormale des spermatozoïdes et fecondité de la semence de taureau. *Elevage et Insémination* No. 153: 4 - 9.

OTT, R.S. 1986. Breeding soundness examination of bulls. *Current Therapy in Theriogenology, 2nd Ed., edited by MORROW D.A., SAUNDER W.B. CO., Philadelphia pp.125 - 136*

PAREZ, M., M., THIBIER. 1983. Contrôle de la fonction sexuelle chez le jeune taurillon. 1. Elev.et Insém.,197: 3 - 16; 2. Elev. et Insém., 198: 3 - Elev. et Insém., 198: 3 - 14.

SAACKE, R.G. 1990. What is abnormal? and is abnormal dependent upon the animal?. Proceeding of the 13th Technical Conference on Artificial Insemination & Reproduction, NAAB, 1990: 67 - 73.

SEKONI, V.O., B.K., GUSTAFSSON and E.C., MATHER. 1981. Influence of Wet Fixation, Staining Techniques and Storage Time on Bull Sperm Morphology. Nord. Vet.-Med, 1981, 33, 161 - 166.

SHAFFER, H.E., and J.O., ALMQUIST. 1949. Vital Staining of Bovine Spermatozoa with An Eosin-aniline Blue Staining Mixture. (Abstract) J. Dairy Sci. (1949) 31: 677 - 678..

SÖDERQUIST, L., L., JANSON, M., HÅARD and EINARSSON. 1992. Factors Affecting The Variation in Sperm Morphological Abnormalities in Swedish Dairy A.I. Bulls.

SWANSON, E.W. and B.J., BEARDEN. 1951. An Eosin-Nigrosin Stain For Differentiating Live and Dead Bovine Spermatozoa. J. Animal sci. Vol. 10, No. 4, November 1951: 981 - 987.

TAMULI, M., and P.F., WATSON. 1993. Use of A Simple Staining Technique to distinguish changes in the Live Sperme Sub Population. Journal of Reproduction and Fertility, Abstract Series No. 11 July 1993.

THIBIER, M., M.A., COLCHEN-BOURLAUD. 1972. Le choix du jeune taurillon sur sa fonction sexuelle. El.et Insém.127: 3 - 47.

THIBIER, M. 1991. Sélection des taureaux sur leurs performances sexuelles pour l'insémination artificielle. 30^e réunion de la société française pour l'étude de la fertilité: Evaluation et amélioration de la fertilité du mâle. Paris, 1991, 51 - 58.

TOURNEUR, J.C, C. C., SILVA MENA, M., THIBIER. 1981. Analyse de la fonction sexuelle des jeunes taurillons de race normande. Elevage et Insémination 183: 27 - 30.

VAN DER SCHAAP, A. 1952. Tijdschr. Diergeneeskunde 77815, 152.

WALE, R.G. and I.C., WHITE. 1960. The susceptibility of spermatozoa to temperature shock. J. Endocrin 19: 211 - 220.

WARREN, E.P., D.T., MAYER and RALP BOGART. 1952. The Validity of The Live-Dead Differential Staining Technique. J. of Animal Sci; Vol. 11, No. 4 (1952) : 803. (Abstracts).

WILLIAMS, W.W. 1921. J. Amer. Vet. Med. Ass., 58: 29.

ANNEXE 1.

Test de l'homogénéité de la variance de la distribution binômiale.

Pour chaque frottis, appelons P_i le pourcentage de colorés dans le i ème comptage d'un frottis (i variant de 1 à 4)

$$p = \frac{\sum p_i}{4} = \text{moyenne des pourcentages de colorés par frottis.}$$

$$q = 1 - p = \text{moyenne des \% de non colorés}$$

$$\frac{p q}{n} = \text{variance théorique entre comptage, où } n = 100 \text{ spermatozoïdes comptés.}$$

Pour chaque frottis,

$$\chi^2 = \frac{\text{variance des pourcentages intra frottis}}{p q / 100.} \times 3.D.L.$$

$$\text{si l'on pose } P_i = \frac{a_i}{100}$$

où a_i est le nombre de colorés dans le i ème comptage.

$$\chi^2 = \frac{S a^2 \times 3 \text{ D.L.}}{a (100 - a) / 100}$$

$$\chi^2 = \frac{\text{SCE de } a \text{ dans le frottis}}{a (100 - a) / 100}$$

La somme des 96 χ^2 est testée pour $3 \times 96 = 288 \text{ D.L.}$

ANNEXE 2 :

Probabilité pour que l'observation des cratères en contraste interférentiel soit due au hasard

Supposons que les chances d'observer 1 cratère soient identiques entre les 3 techniques.

Si l'on considère les 3 techniques:

la probabilité pour qu'un cratère soit vu seulement pour le contraste interférentielle vaut :

$$P = \frac{2400}{2400+2400+19200} = \frac{2400}{24000} = 0,1$$

La probabilité pour que la présence de 8 spermatozoïdes avec cratère soit due au hasard vaut donc : $P^8 = 0,1^8 = 10^{-8}$

Si l'on considère les 2 techniques en phase liquide

$$\text{pour 1 spermatozoïde} \quad P = \frac{2400}{2400 + 2400} = 0,5$$

$$\text{pour 8 spermatozoïdes} \quad P^8 = 0,5^8 = 3,9 \cdot 10^{-4}$$