Examen andrologique de l'étalon

Dr Jérôme PONTHIER, M.Sc., Ph. D., Diplomate ECAR

Pathologie de la Reproduction des Animaux de Compagnie et Equidés,
Clinique des Animaux de Compagnie et des Equidés,
Faculté de Médecine Vétérinaire, ULg Université de Liège,
20 Boulevard de Colonster, B41, B-4000 Liège (Sart-Tilman), Belgique

LINALUX - Mont Le Soie, Centre Européen du cheval,
18 Rue des Champs Elysées, B-5590, Ciney, Belgique

Correspondance : Jerome.Ponthier@ulg.ac.be

1. Libido

Les conditions d'élevage s'éloignent très fort des conditions de saillie en liberté où l'étalon et la jument interagissent longtemps ensemble avant l'accouplement. Il est donc difficile d'estimer la libido d'un étalon de manière objective. Cependant, on estime que l'érection doit être atteinte dans les 5 à 10 minutes suivant la présentation à la jument et que l'éjaculation doit avoir lieu après 6 à 8 coups de rein.

La libido est sous le contrôle de la testostérone qui est dépendante de la sécrétion de LH. Après la puberté, la sécrétion de LH est pulsatile avec un pic de sécrétion qui dure 10 à 20 minutes toutes les 3 à 6 heures (21). Les pathologies dégénératives du testicule très évoluées peuvent mener à une diminution de la sécrétion de testostérone. D'autre part des pathologies tumorales du testicule (leydigome, sertoliome) induisant une sécrétion hormonale peuvent induire des déséquilibres hormonaux ayant une influence sur la libido (18). En cas de manque de libido, il faudra prendre en compte l'âge de l'étalon (certains étalons ayant une puberté tardive), l'examen des testicules et le profil hormonal.

Pour saillir, le dos et les membres postérieurs vont devoir fournir un effort important. Les pathologies ostéo-articulaires peuvent donc limiter l'instinct de saillie de l'étalon (18). D'autre part, le stress ou l'agressivité lors de la saillie ou de la récolte de sperme peuvent aussi devenir des facteurs limitants.

2. Examen physique

Examen général

L'étalon reproducteur doit être un cheval en bonne santé. L'état général du cheval devra être bon : examen clinique normal et embonpoint suffisant.

Un examen orthopédique est nécessaire : l'ataxie ou les douleurs et raideurs des membres postérieurs, du dos limitent les capacités de l'étalon à saillir en toute sécurité (7). Dans les cas les plus graves, les problèmes orthopédiques peuvent mener à l'impossibilité de saillir, nécessitant le recours à des récoltes de sperme à terre (7) ou à des éjaculations induites pharmacologiquement (13) à l'aide d'imipramine et d'alpha-2 agonistes.

Examen du pénis

L'examen de l'étalon reproducteur comprendra un examen du pénis. Le pénis doit pouvoir rentrer dans le fourreau librement, le paraphymosis chronique se caractérisant par une perte de la motricité du pénis et son prolapsus permanent. La présence d'une jument permettra d'obtenir une érection et d'observer la libido (7), mais avec des risques pour la sécurité de l'examinateur. Une tranquillisation avec de l'Acépromazine, ou éventuellement des alpha-2 agonistes, provoquera l'extériorisation du pénis, mais peut causer un paraphymosis chez les étalons débilités (7).

Le pénis extériorisé doit être lavé à l'eau claire afin de détecter les lésions présentes à sa surface (7). Le pénis sera ensuite inspecté et palpé méthodiquement afin de détecter les éventuels ulcères ou tumeurs (7). Les pathologies du pénis peuvent provoquer de la douleur et, de ce fait, compromettre la saillie. De plus, elles provoquent la contamination du sperme par des cellules sanguines ou inflammatoires, qui peuvent interférer avec la qualité du sperme. Les principales pathologies pénis sont :

- les sarcoïdes : tumeurs bénignes à l'aspect prolifératif observées plus fréquemment chez les jeunes chevaux ;
- les carcinomes : tumeurs malignes d'aspect variable (d'ulcératif à exubérant, incluant des formes mixtes), plus fréquemment observées chez les vieux chevaux avec de possibles métastases ganglionnaires;
- les pustules, ou ulcères consécutifs à l'EHV3 : suite à l'infection virale, des papules vont évoluer en pustules et en ulcères. Cette pathologie est très douloureuse et interdit toute saillie. Cependant elle est auto-limitante et guérit spontanément dans les 3 semaines suivant l'infection.
- les lésions d'habronémose : *Habronema spp.* est une mouche pondant ses œufs dans les zones cutanéo-muqueuses humides. Généralement, une ou deux zones indurées sont présentes sur le pénis. Ces lésions sont facilement traitables par des agents anti-parasitaires appliqués sur la peau.

L'examen du pénis comprendra toujours un examen de la fosse urétrale. Des calculs de la fosse urétrale, qui sont des concrétions du smegma, peuvent y être présentes et provoquer de la douleur.

Examen des testicules

La palpation des testicules doit impérativement déterminer si deux testicules sont présents dans les bourses. L'historique des pathologies ayant pu impliquer une castration unilatérale (hernie inguinale, orchite, tumeur testiculaire, torsion testiculaire) sera investigué lors de l'anamnèse. Si l'anamnèse ne mentionne aucune de ces pathologies, l'étalon sera considéré comme cryptorchide. La cryptorchidie ayant une composante héréditaire, un animal cryptorchide sera interdit de reproduction.

Le volume testiculaire est variable entre les races de chevaux. Chez des chevaux de taille moyenne, on estime qu'ils mesurent 5 à 6cm de large, 5 à 6cm de haut et 8 à 10cm de long (7). Le recours à un compas permet de mesurer les différents axes du testicule, mais en y incluant les enveloppes testiculaires. Pour éviter cela, les dimensions testiculaires peuvent être mesuré par échographie. Le volume testiculaire est directement corrélé à la production journalière de spermatozoïdes (DSO, Daily Sperm Output) (21). On estime que 1 gramme de testicule produira 15 à $20x10^6$ spz par jour (7). Le volume testiculaire peut être déterminé par la formule (7):

Volume testiculaire (TV, Testicular volume) en ml = 0.5233 x largeur x longueur x épaisseur (en cm)

Avec cette formule, on peut déterminer la DSO (7) :

DSO (Daily Sperm Output) ($\times 10^9$) = (0.024 x TV) – (0.76 à 1.26)

La dernière constante dépend de la saison et de facteurs individuels à l'étalon. Cependant, le volume testiculaire varie aussi selon la saison (7,11).

Les testicules doivent être fermes et réguliers. Si la consistance est diminuée, une pathologie inflammatoire ou dégénérative devra être envisagée. Une consistance augmentée et un volume diminué évoqueront une pathologie dégénérative de stade avancé. Si la surface n'est pas régulière, le recours à l'échographie sera nécessaire pour déterminer la structure des irrégularités présentes. La température du testicule doit être plus basse que la température corporelle : une température du testicule augmentée évoquera une pathologie inflammatoire (orchite ou épididymite), une torsion testiculaire, une hernie inguinale, un hydrocèle ou un hématocèle.

Dans la bourse, le testicule doit être libre et non adhérent aux enveloppes testiculaires. Son grand axe est longitudinal. La queue de l'épididyme est palpable : une zone ovoïde de 1,5 à 2cm de diamètre, de consistance plus molle que le testicule et située en arrière de celui-ci. Une déviation de l'axe testiculaire évoquera une torsion testiculaire. Une torsion testiculaire avec ischémie, typiquement avec un angle supérieur à 180°, entraînera une douleur aigue. Une torsion non-étranglée ne causera pas de douleur, mais des répercussions au niveau vasculaire et une diminution de la vascularisation peut être visualisée par échographie doppler.

Analyses sanitaires

Pour pouvoir proposer un étalon à la saillie, celui-ci ne doit pas transmettre de maladie vénérienne. La liste des maladies vénériennes à dépister est définie par chaque pays. En Europe, le protocole est le suivant :

- Métrite contagieuse équine (*Taylorella equigenitalis*) : écouvillons du fourreau, de la fosse urétrale et de l'urètre, à répéter à une semaine d'intervalle. Les écouvillons doivent être transportés sur milieu charbon dans les 48 heures suivant le prélèvement ;
- Artérite virale équine : séroneutralisation : si la séroneutralisation est positive, il faudra prouver que l'étalon n'est pas excréteur en réalisant une isolation virale dans le sperme ;
- Anémie infecteuse équine : test de Coggins.

Cette liste décrit uniquement les maladies obligatoires à tester pour exporter du sperme équin en Europe. D'autres pays ou entités ont d'autres exigences avec d'autres listes de maladies.

3. Echographie et doppler

L'échographie permet de d'investiguer le contenu des bourses mais aussi les organes internes du tractus génital par échographie trans-rectale.

Dans la bourse, un très fin film liquidien (anéchogène) peut être présent entre les deux feuillets de la vaginale. En cas de présence de liquide en quantité plus importante entre les deux feuillets, il y aura hydrocèle ou, plus rarement hématocèle. Bien que bénin et souvent secondaire à une autre pathologie, ces pathologies ont des répercussions sur la thermorégulation testiculaire et donc sur la spermatogenèse, avec parfois des atteintes irrémédiables. La présence d'intestin, ou de toute autre structure, dans la bourse est anormale. La grande majorité des hernies inguinales provoque des douleurs de type colique, mais dans certains cas rares, une hernie inguinale non étranglée peut être détectée lors de l'échographie testiculaire. La partie distale du cordon testiculaire peut aussi être visualisée par échographie et le doppler peut permettre d'évaluer le flux sanguin arrivant au testicule (16).

L'échographie du testicule montre une échogénicité élevée (plus échogène que le foie) et homogène. Le centre du testicule montre la présence d'une zone anéchogène de moins de 3mm de diamètre sur l'axe longitudinal : la veine centro-testiculaire. L'examen testiculaire permettra de prendre les dimensions du parenchyme testiculaire sans inclure les enveloppes. De plus, il permettra de comparer l'échogénicité des testicules entre eux et au sein du même testicule (7). Ainsi, des zones moins échogènes bien délimitées dans le testicule font penser à des pathologies localisées dans le testicule comme des tumeurs. Une

diminution d'échogénicité d'un testicule par rapport à l'autre évoquera des lésions dégénératives ou inflammatoires, selon l'examen clinique. Dans certains cas, des zones hyperéchogènes de type fibrose ou calcification seront aussi visibles lors de l'examen échographique (7). Les zones anéchogènes dilatées dans le testicule pourront être observées à l'aide du doppler afin de détecter si un flux est présent : dans ce cas, il y aura présence d'un varicocèle, une dilatation veineuse dans le testicule. Cette pathologie a été associée à une diminution de fertilité chez l'humain (22).

L'épididyme est visible tout le long du pôle dorsal : elle est d'échogénicité hétérogène, le canal de l'épididyme étant liquidien et très flexueux (7). En cas d'inflammation (épididymite), elle apparaîtra comme augmentée de diamètre et avec une lumière épaissie. Des dilatations liquidiennes de l'épididyme sont aussi parfois visualisées. L'épididyme étant l'organe de maturation finale du spermatozoïde pendant 12 jours (21), ces lésions entraineront des conséquences sur la qualité du sperme.

Le tractus génital de l'étalon comprend des glandes annexes, responsables de la sécrétion de la majorité du plasma séminal : les vésicules séminales, la prostate et les glandes bulbo-urétrales. Ces glandes sont difficilement palpables, mais visibles par échographie dans la région du col de la vessie. Les vésicules séminales sont difficilement visibles si elles ne sont pas remplies : pour cela il est conseillé de mettre l'étalon en présence d'une jument pour observer la lumière des glandes remplie par du plasma séminal. La prostate est située sur le col de la vessie, elle mesure ±4cm et a un aspect tissulaire hétérogène comprenant des vésicules anéchogènes (7). Les glandes bulbo-urétrales étant situées en arrière du bassin, elles sont difficilement accessibles. Les ampoules des canaux déférents sont des dilatations de ces derniers. Elles sont visbles le long du col de la vessie (7). Chez certains étalons, une lumière anéchogène est visible. En cas de suspicion d'obstruction des ampoules, pathologie menant à une oligospermie ou une aspermie, leur examen échographique aidera au diagnostic.

4. Analyse de sperme

Volume

Il est difficile de définir une norme pour le volume de l'éjaculat d'un étalon. En effet, l'excitation prolongée va augmenter la sécrétion des glandes annexes et donc le volume. Notre expérience montre qu'un étalon habitué à la récolte et éjaculant rapidement après son entrée en salle de monte aura un volume d'éjaculat de 20 à 40ml tandis qu'un étalon s'étant excité longuement avant de saillir aura un volume d'éjaculat de 60 à 120ml. De plus, il existe des variations individuelles et saisonnières dans le volume de l'éjaculat.

La fraction gel de l'éjaculat est produite par les vésicules séminales (7). Elle devra être filtrée à l'aide de compresses ou de filtres commerciaux (1,7,18) afin d'avoir du sperme utilisable en solution. Cette production de gel est dépendante de facteurs individuels, raciaux et saisonniers.

Couleur

La couleur du sperme doit être grisée à blanche (7). Une couleur rose ou rouge sera associée à une contamination sanguine par des lésions du pénis ou par des pathologies testiculaires (7). La présence de cellules inflammatoires ou d'urine se marquera par une couleur jaune.

La couleur du sperme est un indicateur de sa concentration. Du sperme grisâtre et transparent aura une concentration inférieure à $100x10^6$spz/ml tandis qu'un sperme d'aspect blanc crémeux aura une concentration supérieure à $200\text{-}250x10^6$spz/ml (7).

Concentration

La détermination de la concentration du sperme reposait initialement sur l'utilisation d'hémocytomètres ou de cellules de Thoma (2,7,18). Après dilution du sperme dans un milieu inactivant la mobilité (typiquement, le formol) avec un facteur de dilution connu (respectivement 1/100 ou 1/40, v/v), le nombre de spermatozoïdes observés sur la cellule ou sur une partie de la cellule donnait la concentration. Cependant cette technique est longue et induit parfois des variations.

Des méthodes photométriques ont été développées : elles permettent de mesurer la quantité de lumière absorbée par l'échantillon et d'en déduire la concentration qui est proportionnelle à l'absorbance. Ces méthodes ont une bonne précision et elles ont permis de rendre les manipulations plus rapides. Cependant, ces méthodes ne sont pas utilisables quand le sperme a été dilué dans un milieu opaque, comme le lait, ce qui interdit l'utilisation de ces méthodes pour le sperme frais dilué ou le sperme congelé.

Récemment des méthodes de coloration fluorescentes du noyau ont été mises en place (NucleoCounter™, Chemometc, Allrod, Denmark). Ces méthodes reposent sur la dilution du sperme dans un milieu détergent induisant une perméabilité des membranes cellulaires afin de laisser passer un colorant spécifique du noyau, le propidium iodide (PI)(12). Cette méthode permet de ne compter que les cellules nucléées de manière très précise et sans interférence avec la couleur du milieu (12). Cette

technique se rapproche des méthodes de détermination de la concentration en cytométrie de flux mais en restant accessible et facile d'utilisation.

Il est très difficile de définir une norme pour la concentration en spermatozoïdes dans le sperme d'étalon : plus l'excitation est longue et plus les glandes annexes vont produire de plasma séminal, en diminuant mathématiquement la concentration (1,7,18). Dans notre pratique, chez certains étalons montant sur le mannequin sans excitation préalable, des concentrations supérieures à $600x10^6$spz/ml vont être observées. Chez des étalons étant stimulés longuement avant la saillie, ou chez des étalons montant plusieurs fois sur le mannequin avant d'éjaculer, des concentration inférieures à $100x10^6$spz/ml peuvent être observées. La concentration en spermatozoïdes est diminuée en hiver (11). De plus, lors de récoltes répétées dans des conditions identiques, un effet individuel est souvent observé, la concentration et le volume se stabilisant.

Lors d'un programme de récolte, les premières récoltes permettent de collecter les spermatozoïdes stockés dans la queue de l'épididyme après leur maturation (7). Les premières récoltes, appelées purge, peuvent donc montrer des concentrations très élevées, ce qui correspond à la vidange de la réserve épididymaire. Pour cette raison, nous recommandons d'effectuer un spermogramme après 3 récoltes au minimum réparties sur une semaine.

Nombre total de spermatozoïdes

Le nombre total de spermatozoïdes (Total Sperm Number, TSN) est déterminé en multipliant le volume par la concentration. Pour les raisons énoncées ci-dessus, il est préférable d'attendre la fin de la purge et d'observer une stabilisation du TSN après les premières récoltes avant de tirer des conclusions. Le TSN par éjaculat est généralement compris entre 4 et $12x10^9$spz. Ce nombre est plus constant que la concentration ou le volume. Cependant, il dépend de facteurs individuels, mais aussi de la saison (diminution en hiver) (7,11).

L'étude du TSN peut donner des informations quant à l'activité testiculaire et à l'excrétion des spermatozoïdes quant on le compare à la DSO. Après la purge, un programme de 5 récoltes sur 10 jours permettra d'obtenir une DSO observée par la formule :

$$DSO_{observée} = (TSN_{récolte\ 1} + TSN_{récolte\ 2} + TSN_{récolte\ 3} + TSN_{récolte\ 4} + TSN_{récolte\ 5})/10\ (nbre\ de\ jours)$$

A partir de ces données, la DSO observée sera comparée à la DSO attendue qui est calculée grâce au volume testiculaire déterminé par palpation ou par échographie comme décrit plus haut. Si la DSO observée est plus élevée que la DSO attendue, cela signifiera :

- Soit que la réserve épididymaire n'est toujours pas purgée ;
- Soit que le programme de récolte est trop intense pour l'étalon, et qu'il faut ralentir la fréquence des saillies. Cette observation pourra être confirmée par l'augmentation de la proportion de gouttelettes distales lors de l'examen morphologique (voir plus bas).

Si la DSO observée est plus basse que la DSO attendue, cela signifiera :

- Soit qu'une pathologie testiculaire diminue la production normalement attendue de spermatozoïde ;
- Soit qu'une obstruction est présente sur les voies d'excrétion du sperme, comme par exemple lors d'obstruction des ampoules des canaux déférents.

Présence de cellules non-spermatiques

Des colorations simples d'étalements sur lames, à l'aide de kits de type Diff-Quick® permettent de mettre en évidence des cellules non spermatiques dans le sperme. Cependant, ces techniques ne peuvent être utilisées pour déterminer leur concentration, les cellules non-spermatiques ne se répartissant pas équitablement sur les lames. La présence de globules rouges sur la lame (hémospermie) devra être mise en relation avec une contamination suite à une lésion du pénis ou à l'excrétion de sang par les testicules, épididymes ou glandes annexes. La présence de cellules inflammatoires (leucospermie) est peu décrite chez le cheval. Cependant, une étude a montré que l'ajout in vitro de $5x10^6$neutrophiles/ml dans le sperme induisait une diminution de la mobilité des spermatozoïdes (5).

Récemment, la présence de cellules de type épithélial ou de débris cellulaires dans le sperme frais a été associée avec la concentration en myéloperoxydase et avec une diminution de la qualité du sperme après décongélation (19,20). Cependant, ces cellules n'avaient aucun effet sur la qualité du sperme frais (19,20).

Viabilité

Dans le langage commun de l'andrologie, le terme de viabilité décrit l'intégrité membranaire. Classiquement, l'étalement de spermatozoïdes sur une lame et leur coloration à l'éosine nigrosine permettait de déterminer le pourcentage de spermatozoïdes ayant une membrane intacte : l'éosine ne colorant que les spermatozoïdes dont la membrane était lésée (7). Récemment, l'utilisation de la technologie NucleoCounter™ a permis de simplifier et d'objectiver la méthode de détermination du

pourcentage de spermatozoïdes morts (12). La concentration totale en spermatozoïdes est déterminée par coloration du noyau après rupture des membranes cellulaires dans un milieu détergent. La concentration en spermatozoïdes morts est déterminée par coloration du noyau dans un milieu neutre (comme le PBS) : seuls les spermatozoïdes dont les membranes étaient préalablement lésées sont comptés. Le rapport concentration en spermatozoïdes morts sur concentration en spermatozoïdes totaux donnera ensuite le pourcentage de spermatozoïdes morts. Cette méthode évite le recours aux techniques de cytométrie de flux utilisant le PI qui sont plus complexes et couteuses à mettre en place pour le même résultat. On espère que le pourcentage de spermatozoïdes vivants (à la membrane cellulaire intacte) doit être égal à la mobilité totale et supérieur à 70%.

Mobilité

Il est déconseillé de poser un diagnostic d'infertilité sur base d'un examen du premier éjaculat obtenu. En effet, les spermatozoïdes stockés dans le réservoir de la queue de l'épididyme y vieillissent et y meurent. Il est donc possible d'observer une faible mobilité sur les premiers éjaculats et une amélioration progressive au cours de la purge. Il est donc conseillé de réaliser plusieurs examens de mobilité (3 à 6) (7) et après la période de purge.

La mobilité a longtemps été déterminée par examen de goutte épaisse sous le microscope. L'examinateur déterminait le pourcentage de spermatozoïdes mobiles et de spermatozoïdes avançant en ligne droite, dénommés progressifs, de manière subjective. Pour réaliser un examen au microscope, il doit être équipé d'une plaque chauffante pour maintenir la lame à 37°C. La concentration doit être faible (20 à $30x10^6$spz/ml) et identique entre les différents éjaculats. L'utilisation de concentrations basses et semblables permet à l'œil de déterminer la mobilité de chaque spermatozoïde et évite d'influencer les résultats de mobilité. En effet, l'œil humain est naturellement attiré par la concentration, ce qui influencera positivement les résultats de mobilité si la concentration est plus élevée. L'examen par goutte épaisse au microscope ne permet que de donner une estimation à 5% de la mobilité et pour un même opérateur, la différence interpersonnelle étant parfois élevée.

Les méthodes CASA (Computer Assisted Sperm Analysis) ont permis de standardiser les examens de mobilité totale et progressive dans un même laboratoire et de caractériser le sperme au moyen de plusieurs paramètres (Figure 1a et 1b). L'analyse au CASA demande également d'utiliser une concentration basse : une analyse CASA est validée si la machine utilise entre 700 et 900 cellules, ce qui correspond, pour la plupart des analyseurs, à une concentration comprise entre 20 et $30x10^6$spz/ml. Cette dilution pourra être réalisée avec un milieu à base de lait, comme les extenders utilisés pour l'envoi de sperme frais (7).

Le principe de fonctionnement du CASA repose sur la prise de positions successives de chaque spermatozoïdes. Classiquement, tous les 1/60 de seconde le CASA va prendre les positions des spermatozoïdes pendant 0.5s (30 positions). A partir de cette succession de positions, il tracera la trajectoire curvilinéaire et déterminera la vitesse sur cette courbe (Velocity Curvi Linear, VCL). D'autre part, pour le même spermatozoïde, le CASA ne va prendre en compte que la position de départ et d'arrivée du spermatozoïde après 0,5s. A partir de ces deux positions il va tracer la ligne droite et déterminera la vitesse de cette ligne droite (Velocity Straight Line, VSL). Le CASA va aussi lisser mathématiquement la courbe curvilinéaire sur la ligne droite pour tracer la trajectoire moyenne et en donner la vitesse (Velocity Average Path, VAP). A partir de ces trajectoires, le CASA déterminera les différents rapports montrés à la Figure 1.

La mobilité totale est définie sur base de la VAP : un spermatozoïde est défini comme mobile si sa VAP est supérieure à une vitesse seuil. Le CASA calcule ensuite le pourcentage de spermatozoïdes mobiles. Chez le cheval, la mobilité progressive a été définie sur base de la VAP et de la rectitude (Straightness, STR : rapport de VSL sur la VAP). La VAP minimale est classiquement doublée par rapport à la VAP exigée pour la mobilité totale. Le CASA définit un spermatozoïde comme mobile si sa VAP et sa STR sont supérieures aux seuils fixés. Le CASA calcule ensuite le pourcentage de spermatozoïdes progressifs.

Le matériel d'analyse et les réglages de ces machines ne sont pas standardisés entre laboratoires et il est difficile de comparer les analyses entre des différents centres (9). En effet, ni les vitesses minimales, ni le type de lame, ou le milieu de dilution utilisés pour l'analyse de mobilité ne sont établis. Certaines différences fondamentales entre les cellules de lecture utilisées expliquent les différences de résultats. Deux types de cellules de lectures existent : celles où l'on dépose le sperme entre une lame et son couvre-objet (par exemple, goutte épaisse ou Makler™) et celles ou le sperme déposé sera aspiré par capillarité dans la cellule (Leja™, Isos™). Dans ces dernières, le déplacement du sperme est plus lent et moins rectiligne, ce qui oblige à prendre des réglages moins exigeants. Le Tableau 1. décrit des réglages décrits dans la littérature pour les 2 types de cellules de lecture utilisés.

Tableau 1 : Proposition de réglages de CASA en fonction des cellules de lectures utilisées

	Remplissage direct	Remplissage par capillarité
Mobilité totale	VAP >10-15µm/s (2) VAP >20µm/s (24)	VAP >15µm/s (7)
Mobilité progressive	VAP >10-15µm/s & STR >100% (2) VAP >40µm/s & STR >80% (24)	VAP >30µm/s & STR >50% (7)

Dans du sperme frais de bonne qualité, la mobilité totale doit être supérieure à 70% (2), mais ce facteur est peu pris en compte car la mobilité totale n'a jamais été associée à la fertilité. Dans du sperme frais de bonne qualité, la mobilité progressive est supérieure à 50-60%. Cependant des valeurs inférieures ne sont pas rédhibitoires. En effet, une dose de sperme frais contenant $500x10^6$spz progressifs (7) (voire $300x10^6$) est considérée comme suffisante pour observer une fertilité satisfaisante. Il faudra donc mettre les résultats en relation avec la concentration, le TSN et l'utilisation désirée de l'étalon.

Morphologie

L'examen morphologique peut être réalisé par étalement du sperme sur une lame et coloration rapide par un kit de type Diff-Quick® (3). Cependant, cette méthode peut provoquer des lésions des spermatozoïdes et donc interférer avec les résultats. Actuellement, l'examen morphologique est idéalement réalisé après dilution (1/40 v/v) de sperme dans du formol maintenu à 37°C pour éviter un choc thermique. Une goutte de 5µl de cette solution sont ensuite déposée sur une lame maintenue à 37°C, placée sous une lame couvre-objet et observée sous microscopie de contraste (7). Il est ensuite recommandé de compter 200 spermatozoïdes au minimum (6,7).

Les anomalies morphologiques des spermatozoïdes sont décrites à la Figure 2. Ces anomalies sont divisées en deux grands groupes. Les anomalies primaires sont des malformations du spermatozoïde produit dans le testicule et les anomalies secondaires sont dues à des défauts de maturation ou de manipulation du sperme. Par exemple, une queue enroulée dans sa partie distale peut être le signe d'un choc thermique. D'autre part, la proportion de gouttelettes distales révèle une utilisation de spermatozoïdes n'ayant pas fini leur maturation dans la partie distale de l'épididyme. En cas de programme trop intense de récolte de l'étalon, les spermatozoïdes qui ne sont pas entièrement maturés seront de plus en plus recrutés. Ce phénomène fera augmenter la proportion de gouttelettes distales dans le sperme et sera à corréler avec la DSO calculée grâce au volume testiculaire de l'étalon.

Cytométrie de flux

Le recours à des molécules fluorescentes pouvant marquer spécifiquement certaines parties du spermatozoïde avait déjà permis d'en étudier les structures sous épifluorescence. L'analyse par cytométrie de flux permet de standardiser l'interprétation de la fluorescence émise par les sondes moléculaires spécifiques aux différentes parties du spermatozoïde (23). Diverses structures du spermatozoïde ont été étudiées : la fragmentation de l'ADN déterminée par l'acridine orange (4), le potentiel mitochondrial et l'apoptose étudiés par la coloration JC-1 & 7-AAD, l'intégrité de la membrane étudiée par le PI et l'intégrité de l'acrosome déterminée par le PNA (15). La peroxydation membranaire et la concentration en calcium dans le spermatozoïde peuvent aussi être déterminées par ces méthodes.

Ces méthodes ont déjà montré un grand intérêt clinique : chez l'homme, la fragmentation du DNA est reliée à la fertilité du sperme (8) et chez le cheval le potentiel des mitochondries dans le sperme frais permet de prévoir la qualité du sperme après décongélation (17). Cependant, les valeurs seuils de chaque test ne sont pas fixées et les seules observations cohérentes se font en comparant un individu de fertilité inconnue à un individu de fertilité connue (14), ce qui limite les comparaisons entre équipes.

Dosages dans le sperme

En cas d'absence de spermatozoïdes dans l'éjaculat, le dosage des phosphatases alcalines permet de différencier une aspermie vraie (absence de production de spermatozoïdes) d'une obstruction des ampoules des canaux déférents. Le testicule et l'épididyme produisant de grandes quantités de phosphatase alcaline, celle-ci sera élevée si l'étalon est en aspermie et basse si il y a une obstruction des voies spermatiques.

Le dosage de l'urée et de la créatinine peuvent avoir un intérêt lorsque le sperme est d'aspect jaunâtre, afin de déterminer si l'éjaculat a été contaminé par de l'urine. De la même manière, en cas de suspicion d'éjaculation rétrograde, de l'urine pourra être récoltée après la saillie. Après centrifugation, le culot cellulaire pourra être examiné au microscope afin de mettre en évidence la présence de spermatozoïdes.

5. Endoscopie

Lors de suspicion de phénomène inflammatoire des vésicules séminales, une endoscopie urinaire et un cathétérisme des canaux des vésicules séminales peut être tenté sous forte sédation. Ces canaux se trouvent en arrière du col de la vessie à 2 et 10h au plafond de l'urètre. Une fois le cathéter placé dans les canaux excréteurs, un lavage est réalisé et une bactériologie est demandée sur le lavage.

6. Biopsie testiculaire

La biopsie testiculaire est le moyen utilisé en dernier recours pour le diagnostic d'infertilité. En effet, la rupture de la barrière hémo-spermatique fait courir le risque de formation d'anticorps contre les spermatozoïdes et donc de dégénérescence testiculaire. Lorsque la production testiculaire est très atteinte sans que les examens précédents ne puissent l'expliquer, la biopsie testiculaire permettra parfois de conclure mais risque aussi d'aggraver la situation.

Deux techniques de biopsie sont décrites. L'aspiration à l'aiguille fine suivie d'un étalement peut être réalisée assez facilement, mais dont l'interprétation n'est pas toujours conclusive. La biopsie à proprement parler se déroule au bloc opératoire et nécessite une suture des structures incisées. Les pièces obtenues permettent de poser un diagnostic mais aussi un pronostic.

7. Dosages hormonaux

Les dosages hormonaux ont généralement peu d'intérêt lors de l'évaluation andrologique des étalons. La testostérone est sécrétée de manière cyclique chez le mâle : on compte 4 à 6 pics de testostéronémie par jour. Pour estimer si la concentration en testostérone est suffisante, il faudra donc réaliser un test de stimulation avec une hormone à effet LH (classiquement, l'hCG). La testostérone est parfois diminuée chez des individus en dégénérescence testiculaire très avancée. L'oestrone sulfate est naturellement sécrétée en grande quantité par l'étalon, mais elle est très variable entre individus, ne donnant que peu d'information clinique (10).

8. Conclusions

Les données obtenues lors de l'examen andrologique et les objectifs de l'étalon doivent être intégrés avant de donner des conclusions définitives. L'examen andrologique ne se réalise pas sur une journée : du temps et de la préparation sont nécessaires pour obtenir des données interprétables. Même si le volume, la concentration et la mobilité de l'éjaculat restent des valeurs cruciales dans l'analyse de l'éjaculat, les techniques modernes et l'intégration des différentes données sont nécessaires pour donner un diagnostic précis.

Bibliographie

1. *Amann RP. Physiology and endocrinology. In: McKinnon A.O. VJL (ed), Equine Reproduction, 1 edition. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993;658-685.*
2. *Amann RP, Graham JK. Spermatozoal function. In: McKinnon AO,Voss JL (eds), Equine Reproduction. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993;715-745.*
3. *Aziz N, Saleh RA, Sharma RK, Lewis-Jones I, Esfandiari N, Thomas AJ, Jr., Agarwal A. Novel association between sperm reactive oxygen species production, sperm morphological defects, and the sperm deformity index. Fertil Steril 2004;81: 349-354.*
4. *Baumber J, Ball BA, Linfor JJ, Meyers SA. Reactive oxygen species and cryopreservation promote DNA fragmentation in equine spermatozoa. J Androl 2003;24: 621-628.*
5. *Baumber J, Vo A, Sabeur K, Ball BA. Generation of reactive oxygen species by equine neutrophils and their effect on motility of equine spermatozoa. Theriogenology 2002;57: 1025-1033.*
6. *Bjorndahl L, Soderlund I, Johansson S, Mohammadieh M, Pourian MR, Kvist U. Why the WHO recommendations for eosin-nigrosin staining techniques for human sperm vitality assessment must change. J Androl 2004;25: 671-678.*
7. *Brinsko SP, Blanchard TL, Varner DD, Schumacher J, Love CC, Hinrichs K, Hartman D. Manual of Equine Reproduction, Third Edition edition. Maryland Heights: Mosby Elsevier, 2011;323.*
8. *Evenson D, Jost L. Sperm chromatin structure assay is useful for fertility assessment. Methods Cell Sci 2000;22: 169-189.*
9. *Hoogewijs M, De Vliegher S, De Schauwer C, Govaere J, Smits K, Hoflack G, de Kruif A, Van Soom A. Validation and usefulness of the Sperm Quality Analyzer V equine for equine semen analysis. Theriogenology 2011;75: 189-194.*
10. *Illera JC, Silvan G, Munro CJ, Lorenzo PL, Illera MJ, Liu IK, Illera M. Amplified androstenedione enzymeimmunoassay for the diagnosis of cryptorchidism in the male horse: comparison with testosterone and estrone sulphate methods. J Steroid Biochem Mol Biol 2003;84: 377-382.*
11. *Janett F, Thun R, Niederer K, Burger D, Hassig M. Seasonal changes in semen quality and freezability in the Warmblood stallion. Theriogenology 2003;60: 453-461.*
12. *Johansson CS, Matsson FC, Lehn-Jensen H, Nielsen JM, Petersen MM. Equine spermatozoa viability comparing the NucleoCounter SP-100 and the eosin-nigrosin stain. Anim Reprod Sci 2008;107: 325-326.*
13. *McDonnell SM. Oral imipramine and intravenous xylazine for pharmacologically-induced ex copula ejaculation in stallions. Anim Reprod Sci 2001;68: 153-159.*
14. *Morrell JM. Update on semen technologies for animal breeding. Reprod Domest Anim 2006;41: 63-67.*
15. *Oliveira CH, Vasconcelos AB, Souza FA, Martins-Filho OA, Silva MX, Varago FC, Lagares MA. Cholesterol addition protects membrane intactness during cryopreservation of stallion sperm. Anim Reprod Sci 2010;118: 194-200.*
16. *Ortega Ferrusola C, Gracia-Calvo J, Duque J, Martin-Cuervo M, Ibanez-Garcia I, Ezquerra J. Evaluation of testicular perfusion with color and pulsed Doppler ultrasonography after "standing laparoscopic peritoneal flap hernioplasty technique". International Symposium on Stallion Reproduction VI (ISSR VI), Vienna, 2012;504.*
17. *Ortega-Ferrusola C, Garcia BM, Gallardo-Bolanos JM, Gonzalez-Fernandez L, Rodriguez-Martinez H, Tapia JA, Pena FJ. Apoptotic markers can be used to forecast the freezeability of stallion spermatozoa. Anim Reprod Sci 2009;114: 393-403.*
18. *Pickett BW. Reproductive Evaluation of the stallion. In: McKinnon A.O. VJL (ed), Equine Reproduction, 1 edition. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993;755-768.*
19. *Ponthier J, de la Rebiere de Pouyade G, Desvals M, Spalart M, Franck T, Serteyn D, Deleuze S. Is neutrophil elastase associated with myeloperoxidase concentration and post-thawing parameters in equine frozen semen? Anim Reprod Sci 2010;121S: S200-S202.*
20. *Ponthier J, Desvals M, Franck T, de la Rebiere de Pouyade G, Spalart M, Palmer E, Serteyn D, Deleuze S. Myeloperoxidase in equine semen: Concentration and Localization during freezing processing. Journal of Equine Veterinary Science 2012;32: 32-37.*
21. *Senger PL. Pathways to pregnancy and parturition, second edition. Pullman,, 2005;373.*
22. *Smith R, Kaune H, Parodi D, Madariaga M, Rios R, Morales I, Castro A. Increased sperm DNA damage in patients with varicocele: relationship with seminal oxidative stress. Hum Reprod 2006;21: 986-993.*
23. *Varner DD. Developments in stallion semen evaluation. Theriogenology 2008;70: 448-462.*
24. *Vidament M. French field results (1985-2005) on factors affecting fertility of frozen stallion semen. Anim Reprod Sci 2005;89: 115-136.*