

La propédeutique de l'appareil reproducteur et l'examen du sperme des ruminants.

Prof. Ch. Hanzen

Année 2015-2016

Université de Liège

Faculté de Médecine Vétérinaire

Service de Thériogenologie des animaux de production

Courriel : Christian.hanzen@ulg.ac.be

Site : <http://www.therioruminant.ulg.ac.be/index.html>

Publications : <http://orbi.ulg.ac.be/>

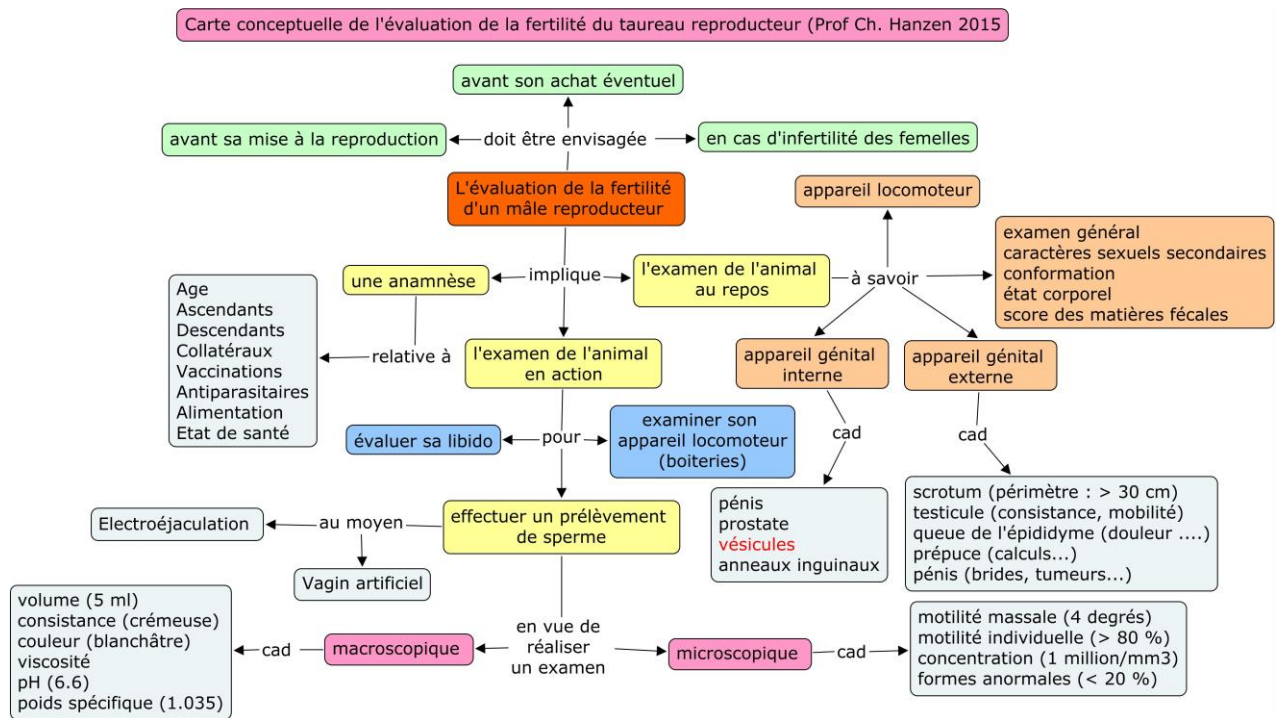
Facebook : <http://facebook.com/theriogenologie>

Table des matières

1.	Objectifs du chapitre	4
1.1.	Objectif général	4
1.2.	Objectifs spécifiques.....	4
1.2.1.	Objectifs de connaissance	4
1.2.2.	Objectifs de compréhension	4
1.2.3.	Objectifs d'application	4
2.	Introduction	5
3.	Caractéristiques pubertaires	5
3.1.	Définitions de la puberté	5
3.2.	Facteurs d'influence	6
4.	Evaluation de l'instinct sexuel	6
5.	Examen général de l'état sanitaire et de l'appareil locomoteur	7
6.	Examen de l'appareil reproducteur.....	7
6.1.	Rappels anatomiques généraux.....	7
6.2.	L'appareil génital externe	9
6.2.1.	Conformation du scrotum.	9
6.2.2.	Palpation du contenu scrotal	9
6.2.3.	Biopsie testiculaire	10
6.2.4.	Détermination du volume scrotal	10
6.4.2.1.	Intérêt de la méthode et facteurs de variation	10
6.4.2.2.	Méthode de détermination du périmètre scrotal	10
6.3.	L'appareil génital interne : la palpation transrectale*	11
6.4.	Les prélèvements.....	11
6.5.	Les examens complémentaires	12
6.5.1.	L'endoscopie	12
6.5.2.	L'échographie	12
7.	Méthodes de récolte du sperme	12
7.1.1.	Le vagin artificiel	12
7.1.1.1.	Taureau	13
7.1.1.2.	Bélier	13
7.1.1.3.	Bouc	13
7.1.2.	L'électro-éjaculation	14

7.2.1.1. Taureau	14
7.2.1.2. Bélier	15
7.2.1.3. Autres espèces	15
7.1.3. Autres méthodes	15
8. Examen du sperme.....	15
8.1. Examens macroscopiques	16
8.1.1. Volume	16
8.1.2. Aspect et consistance	16
8.1.3. Couleur	16
8.1.4. Viscosité , pH et poids spécifique	16
8.1.5. Recherche des polynucléaires	16
8.2. Examen microscopique du sperme.....	17
8.2.1. Détermination de la motilité massale	17
8.2.2. Détermination de la motilité individuelle	17
8.2.3. Détermination de la concentration	18
8.2.4. Examen morphologique	19
8.4.2.1. Quelques rappels	19
8.4.2.2. Principes généraux	20
8.4.2.3. Anomalies morphologiques	22
8.2.5. Examen bactério-virologique	24
8.2.6. Examens complémentaires	24
8.3. Interprétations	24
8.3.1. Taureaux de monte naturelle	24
8.3.2. Taureaux destinés tardivement à l'insémination artificielle	25
8.3.3. Taureaux de la filière insémination artificielle	25
9. Pour en savoir plus.....	25
10. Tableaux	26

La propédeutique de l'appareil reproducteur et l'examen du sperme des ruminants 3.



1. Objectifs du chapitre

1.1. Objectif général

Ce chapitre décrit les méthodes propédeutiques permettant de reconnaître un mâle capable physiquement et comportementalement de déposer au niveau du tractus génital femelle un sperme viable, irréprochable sur le plan sanitaire et apte à assurer une fécondation. Il concerne non seulement l'examen externe et interne de l'animal au repos et en action mais aussi le prélèvement et l'examen du sperme. Ne seront envisagés dans ce chapitre que les aspects relatifs aux ruminants.

1.2. Objectifs spécifiques

1.2.1. Objectifs de connaissance

1. Enoncer les indications et méthodes de la propédeutique d'un taureau
2. Définir la puberté
3. Décrire la méthodologie de la palpation des bourses
4. Enoncer les buts de la palpation du scrotum.
5. Décrire la méthode de mesure du périmètre scrotal.
6. Citez les méthodes d'examen du pénis chez le taureau au repos
7. Décrire les structures anatomiques génitales palpées par voie transrectale chez le taureau
8. Enoncer un critère de diagnostic d'une libido normale chez le taureau
9. Décrire les phases de l'accouplement chez le taureau
10. Enoncer un paramètre d'évaluation de la libido du taureau
11. Décrire les méthodes de prélèvement du sperme
12. Faire le schéma d'un vagin artificiel pour le prélèvement de sperme de taureau
13. Enoncer les divers paramètres de l'examen macroscopique du sperme des ruminants
14. Enoncer les caractéristiques macroscopiques normales du sperme des ruminants
15. Enoncer les divers paramètres de l'examen microscopique du sperme des ruminants
16. Enoncer les caractéristiques microscopiques normales du sperme des ruminants
17. Enoncer la concentration normale en spermatozoïdes du sperme des ruminants
18. Citer les principales anomalies des spermatozoïdes
19. Enoncer les champs d'application de l'échographie chez le taureau

1.2.2. Objectifs de compréhension

1. Justifier l'importance de l'examen général et de l'appareil locomoteur du taureau
2. Expliquer l'intérêt de l'inspection et de la palpation du fourreau
3. Justifier l'importance de l'examen de l'appareil locomoteur du taureau en action
4. Justifier l'importance de l'examen du pénis du taureau en action
5. Expliquer les contraintes des méthodes de prélèvement de sperme
6. Expliquer le principe et les indications du prélèvement préputial
7. Expliquer la méthode de détermination de la mobilité massale.
8. Expliquer la méthode de détermination de la mobilité individuelle
9. Expliquer la méthode de détermination de la concentration.
10. Expliquer le principe de la coloration vitale.

1.2.3. Objectifs d'application

1. savoir faire le choix d'un vagin artificiel adapté à l'espèce
2. savoir monter un vagin artificiel

2. Introduction

Classiquement, l'examen d'un mâle reproducteur peut être réalisé *avant son acquisition*; l'acheteur évite ainsi de payer pour une non valeur économique et le vendeur assure sa réputation comme fournisseur d'animaux fertiles; *avant la mise à la reproduction* de l'animal c'est-à-dire un ou deux mois avant le début de la période de reproduction pour permettre au propriétaire d'apprécier le potentiel reproducteur de son animal ou lui donner le temps de faire l'acquisition d'un autre reproducteur; *après l'observation d'une infertilité*: Cette dernière situation est la plus fréquente lors de monte naturelle.

Trois facteurs conditionnent la fertilité d'un mâle : sa libido, son état de santé et son sperme. L'évaluation de chacun de ces paramètres conjointement à l'anamnèse revêt une importance essentielle dans la détermination de la fertilité d'un individu ou l'identification d'un problème de fertilité au sein d'un troupeau bovin, ovin, caprin ou porcin. L'examen du mâle a pour but de déterminer sa capacité physique et comportementale à déposer au niveau du tractus génital femelle un sperme viable, irréprochable sur le plan sanitaire et apte à assurer une fécondation.

L'évaluation de la fertilité d'un mâle n'est pas chose aisée car le pouvoir fécondant du sperme dépend d'une multiplicité de facteurs dont bien peu sont appréciables. Cette évaluation comprend 3 aspects : (1) L'anamnèse visera à déterminer l'origine de l'animal, sa fertilité antérieure ainsi que celle de ses collatéraux, ascendants et descendants éventuels. Il faudra également s'enquérir de son âge, de son état de santé actuel et passé, de son alimentation, du nombre de saillies effectuées, de ses vaccinations ; (2) l'examen de l'animal au repos à savoir l'examen général, l'examen de l'appareil locomoteur et l'examen de l'appareil reproducteur interne et externe, (3) l'examen de l'animal en action pour évaluer la libido et l'appareil locomoteur et enfin l'examen du sperme.

3. Caractéristiques pubertaires

3.1. Définitions de la puberté

L'acquisition d'une fonction de reproduction s'étalant dans le temps, il est difficile de parler d'âge de la puberté. Cet âge pourrait se définir comme celui auquel les fonctions de reproduction ont atteint un minimum d'efficacité. Ce minimum a bien entendu une connotation arbitraire et dépend des critères employés. Quelques exemples peuvent en être donnés pour l'espèce bovine.

Chez le *taureau*, la lumière des tubes séminifères apparaît entre le 3^{ème} et le 5^{ème} mois et leur diamètre augmente jusqu'à 10 mois. Le début de la production de spermatozoïdes matures dans le testicule s'observe entre 7.5 et 8.5 mois, ce qui correspond à la manifestation des premiers désirs sexuels et à la première extériorisation du pénis. Ce dernier se sépare complètement du fourreau vers 9 mois. La production journalière de spermatozoïdes par gramme de testicule est équivalente à celle de l'adulte entre 9 et 12 mois.

L'âge de la puberté est le plus souvent déterminé en pratique comme l'âge auquel le premier éjaculat obtenu renferme 50 millions de spermatozoïdes avec une motilité progressive de 10 %. La *première éjaculation* peut être obtenue dès 8 mois et en moyenne entre 9 et 10.5 mois. Il existe bien entendu de larges différences entre les races et les individus et en moyenne, l'âge de la puberté étant compris entre 5 et 15 mois.

Comparant des jeunes taureaux de race Blonde d'Aquitaine, Frisonne Pie Noire, Normande, Holstein et Montbéliard, certains auteurs observent une *activité de monte* à 9 et 15 mois comprise respectivement entre 32 et 56 % et entre 81 et 100 % des cas, l'âge moyen de la première récolte de sperme étant quant à lui compris entre 43 et 46 semaines.

Une fois acquise la puberté, l'efficacité de la *production de spermatozoïdes* ne serait optimale que 14 à 16 semaines plus tard, le nombre total de spermatozoïdes récoltés dans un éjaculat étant à 15 mois et selon les races compris entre 2.5 et 4.2 milliards. Cette production s'améliore encore avec le temps,

passant par une valeur optimale vers l'âge de trois ans, se maintenant jusque l'âge de 6 à 7 ans puis diminuant par la suite.

Le *pourcentage de spermatozoïdes anormaux* diminue entre 12 et 15 mois d'âge.

Le *périmètre scrotal* (PS) augmente avec l'âge du taureau mais diminue avec le temps : de 2 cm par mois entre 6 et 10 mois elle n'est plus que de 0.3 cm par mois entre 15 et 18 mois. Des valeurs minimales pour un âge donné ont été déterminées. Ainsi, des valeurs respectivement inférieures à 25 et 28 cm sont considérées comme anormales pour des taureaux Blonds d'Aquitaine et Holstein âgés d'un an. De même en race Blanc Bleu Belge, des valeurs de 26 cm et 22 cm ont été notées respectivement pour des taureaux de type conventionnel et hypermusclé âgés de 8 mois. A 1 an, ces valeurs étaient respectivement égales à 36 et 32 cm pour un poids de 478 et 460 kgs (Michaux et Hanset 1981).

3.2. Facteurs d'influence

Divers autres facteurs sont susceptibles d'influencer la précocité sexuelle des taureaux. Il en est de classiques tels que l'*année*, la *saison* ou l'*exploitation*. La meilleure manière d'identifier l'influence de ces facteurs, est de comparer les animaux en termes de déviation par rapport à un groupe de contemporains. D'autres facteurs sont plus spécifiques. La plupart des auteurs décrivent une relation positive entre les mensurations testiculaires et le *poids ou le gain de poids* jusque l'âge de 15 mois. On a également décrit une relation positive entre l'augmentation du PS et l'*âge de la mère*, la différence étant surtout importante entre les primipares et les multipares. La consanguinité exerce un effet défavorable sur les performances de reproduction des taureaux.

L'*alimentation* altère davantage la fonction sexuelle des jeunes taureaux que celle de taureaux plus âgés. La distribution d'un régime à des taureaux Holstein ne couvrant que 60 % des besoins entre 2 et 46 mois retarde la puberté de 8 semaines. Le retard ainsi enregistré compromet la fonction sexuelle ultérieure. Au cours de la puberté, une carence en vitamine A ou en carotène affecte de manière permanente voire irréversible, la fonction sexuelle des jeunes taureaux ce qui ne semble plus être le cas après cette période. Une suralimentation peut également être préjudiciable à la fonction de reproduction (« un bon coq n'est jamais gras »). Un effet indirect sur le mécanisme de thermorégulation des testicules a été suspecté (dépôt de graisse sur les testicules et dans le cordon testiculaire).

4. Evaluation de l'instinct sexuel

On peut raisonnablement estimer qu'un *taureau* sur cinq présente un instinct sexuel incompatible avec une fertilité normale. C'est dire l'importance de ce paramètre encore trop peu souvent évalué. Le principe en est simple. Il faut disposer d'une ou de plusieurs femelles en chaleurs (de préférence) ou non, éventuellement tranquillisées au moyen de 0.03 mg/kg IV de xylazine. Leur vagin sera préalablement lubrifié au moyen d'un gel pour éviter d'éventuelles lésions induites par des saillies répétées. Un *taureau* expérimenté peut constituer un excellent facteur de stimulation pour le *taureau* à tester. Quatre aspects sont à distinguer : la libido, le saut, l'intromission du pénis et l'éjaculation.

La *libido* consiste en la réaction de l'animal en présence d'une femelle en chaleurs. On déterminera le nombre de montes réalisées pendant une période de 15 à 20 minutes. Si au bout de cette période, aucune voire une seule monte a été effectuée, on peut estimer la libido comme faible. Elle est considérée comme moyenne si 2 à 3 montes ont été réalisées et comme excellente si ce nombre est égal ou supérieur à 4. On se souviendra que la virilité dépend davantage de la rapidité de la monte que de son intensité. La libido nous renseigne sur l'appétit sexuel du taureau. Elle varie selon la race, l'âge de l'animal et son état de santé. Durant cette phase on peut observer l'écoulement de sécrétions des glandes annexes. L'identification d'une manifestation de *flehmen* est également importante en présence d'une femelle en chaleurs (voir chapitre relatif à la détection des chaleurs).

Le *saut* nous renseigne sur l'intégrité physique de l'appareil locomoteur du taureau et permet de noter le degré de turgescence et de la longueur de la partie extériorisée du pénis

L'*intromission* du pénis se fait chez le taureau rapidement et sans difficulté. Elle s'accompagne d'un saut en avant sur les membres postérieurs (coup de rein). La durée de l'intromission du pénis est extrêmement variable selon les espèces animales. Elle est rapide et l'éjaculation instantanée chez le *taureau* et le *bélier* ; elle est plus tardive chez le *verrat* chez qui la durée de l'accouplement peut durer

plus de 15 minutes. Certains *taureaux* et *étalons* effectuent des tentatives de monte avant tout début d'érection. Certains facteurs peuvent modifier le comportement sexuel de certains animaux : présence de personnes étrangères, lésions du pénis, du squelette, des articulations...

5. Examen général de l'état sanitaire et de l'appareil locomoteur

Il est de la responsabilité du vétérinaire de procéder à un examen général de l'animal pour en préciser notamment l'état corporel, la présence des caractères sexuels secondaires, la nature des matières fécales,

L'examen de l'appareil locomoteur revêt une importance essentielle puisque les animaux seront amenés à parcourir parfois de longues distances au pâturage et que lors de la saillie, c'est sur les membres postérieurs (jarrets, colonne vertébrale) que reposera l'entièreté du poids de l'animal. On veillera à identifier dès que possible des lésions à caractère héréditaire telles que la contracture des gastrocnémiens.

6. Examen de l'appareil reproducteur

6.1. Rappels anatomiques généraux

Embryologiquement, le testicule a une origine mésonéphrotique tout comme l'épididyme, le canal déférent les vésicules séminales. La prostate et les glandes bulbo-urethrales dérivent du sinus urogénital tandis que le pénis se forme par tubulation et élongation du tubercule génital. Les facteurs responsables de cette différenciation sexuelle ont été envisagés dans le chapitre relatif aux pathologies du tractus génital femelle (free-martinisme). Une caractéristique du tractus génital mâle est le processus de la descente ou migration testiculaire de l'abdomen dans le sac scrotal au travers de l'anneau et du trajet inguinal. Ce processus se traduit dans certains cas par des anomalies telles la monorchidie ou la cryptorchidie qui du fait de la modification de la thermorégulation entraîne des troubles de la spermatogenèse sans que pour autant la fonction endocrine du testicule soit modifiée. Une autre caractéristique de la fonction de reproduction du mâle est la manifestation d'une capacité d'érection bien avant celle de la spermatogenèse. Une troisième enfin est le mécanisme de thermorégulation assuré au niveau du scrotum. La peau du scrotum présente des récepteurs thermiques qui ont notamment pour effet le cas échéant d'abaisser la température corporelle. Elle a aussi de nombreuses glandes sudoripares. Par ailleurs, le cremaster peut modifier la position plus ou moins haute (taureau) du testicule : le testicule remonte et se trouve davantage en contact avec la paroi abdominale si l'environnement est froid, l'inverse se produit si la température extérieure augmente. Enfin, compte tenu des contacts circonvolués étroites entre les artères et les veines testiculaires au niveau du plexus pampiniforme, le sang qui arrive au testicule est refroidi par celui qui en sort. Ainsi chez le bélier une différence de 4°C a été constatée. La disposition de surface des artères et veines testiculaires contribue à accentuer ce mécanisme thermorégulateur.

Le *testicule* présente une position et une orientation dans le scrotum qui varie selon les espèces animales : verticale chez le taureau et le bélier, elle est davantage horizontale chez l'étalon et le verrat. La taille du testicule varie selon la saison dans les espèces dites saisonnières telles le bélier, l'étalon ou le chameau. L'ablation d'un testicule entraîne par ailleurs l'élargissement conséquent de l'autre (> 80 %). Chez le monorchide, l'ablation d'un testicule descendu peut entraîner la descente de l'autre testicule. La tête de l'*épididyme* comporte 13 à 20 conduits qui se réunissent en un seul extrêmement circonvolué au niveau du corps puis de la queue de l'épididyme. Sa longueur est de 36 mètres chez le taureau et de 54 mètres chez le verrat. La maturation du spermatozoïde est assurée au niveau de la tête et du corps tandis que la queue est impliquée dans le stockage. Le *canal déférent* s'élargit en une *ampoule* (résorption liquidienne et spermiphagie) qui s'abouche à l'*urètre*. L'ampoule du canal déférent a chez le taureau une longueur de 10 à 15 cm et une largeur de 5 à 8 mm. La queue de l'épididyme constitue le principal lieu de stockage extragonadique (75 %) et l'ampoule le second (25%). Les *glandes annexes* présentent diverses caractéristiques spécifiques. Les vésicules séminales s'étalent

latéralement dans le bassin entre les ampoules des canaux déférents et le col de la vessie. Elles sont lobulées et compactes chez les ruminants. Elles ont chez le *taureau* une longueur comprises entre 8 et 15 cm, une largeur de 3 à 5 cm et une épaisseur de 1 à 2 cm. Leur taille varie selon les individus. Elles sont nettement lobulées et mobiles. Chez l'*étalon* elles sont allongées et nettement piriformes, larges et moins compactes chez le verrat. La *prostate* comprend deux parties l'une (corps de la prostate) petite chez le taureau et large chez le verrat et une partie disséminée autour de l'urètre et s'étendant jusqu'aux glandes bulbo-urétrales (glandes de Cowper). Le corps de la prostate a chez le taureau une longueur de 3 cm, une largeur d'1 cm et une hauteur de 2 à 3 cm. Chez l'étalon la prostate est essentiellement externe. Les glandes bulbo urétrales sont situées dans la portion postérieure de l'urètre. Grandes chez le verrat, elles secrètent un gel semblable à du tapioca. Elles régressent après castration. Chez le taureau elles sont pratiquement recouvertes par le muscle bulbospongieux. Les glandes urétrales sont absentes chez le taureau. Elles correspondent à la partie disséminée de la prostate chez l'étalon. Le rôle exact des glandes annexes est loin d'être défini. Selon les espèces elles renferment de substances plus ou moins spécifiques tel l'acide citrique et le fructose dans les vésicules séminales des ruminants, l'acide citrique dans les vésicules séminales de l'étalon, de grandes quantités d'inositol et ergothionéine chez le verrat. Par ailleurs, les spermatozoïdes de la queue de l'épididyme sont capables d'assurer une fécondation. La sécrétion des glandes bulbouretrales du verrat forme un bouchon cervical une fois la saillie réalisée.

D'une longueur comprise entre 80 et 110 cm, le *pénis* du *taureau* est de nature fibroélastique comprend anatomiquement trois parties : la racine, le corps et l'extrémité libre. La *racine du pénis* est formée de deux structures recouvertes par le muscle ischio-caverneux se fixant au bord postérieur du bassin entre les deux tubérosités ischiatiques. Entre elles passe l'urètre entouré dorsalement et ventralement dans sa portion pelvienne du corps spongieux. Ce dernier présente une dilatation au niveau de la courbure ischiatique (bulbe du pénis). Cette dilatation est recouverte par les deux muscles bulbo-spongieux jointifs. Ceux-ci sont recouverts par les deux muscles rétracteurs du pénis séparés de quelques cm et fixés d'une partie au niveau de la première vertèbre coccygienne et d'autre part en arrière du pénis au niveau de l'S pénien. La racine du pénis joue essentiellement le rôle du pompe impliquée dans le mécanisme de l'érection et de l'éjaculation. Le *corps du pénis* comprend la partie comprise entre la partie libre du pénis et la jonction des structures formant la racine du pénis. Une coupe transversale de cette partie permet de distinguer dorsalement le corps caverneux et ventralement l'urètre entouré du corps spongieux. Ces deux structures sont chez le *taureau* et le *verrat*, à la différence de l'*étalon* entourés par l'albuginée. Les espaces vasculaires du corps caverneux s'organisent à la portion proximale du pénis en deux canaux dorsaux qui se réunissent par la suite pour se diviser au niveau de l'S pénien en deux canaux ventraux. Cette portion du pénis sert essentiellement à l'intromission pénienne. L'S pénien représente environ $\frac{1}{4}$ de la longueur du pénis. Il est absent à la naissance chez le veau. Une première ébauche de flexion s'amorce vers l'âge de 3 mois et se développe surtout entre 4 et 6 mois, âge auquel commence véritablement la protrusion du pénis, impossible auparavant chez le veau. L'*extrémité libre du pénis* est celle visible dans la cavité préputiale. Elle est de forme asymétrique et tordue. Le corps spongieux se prolonge dans le gland du pénis. Cette portion a une fonction essentiellement sensitive. L'architecture de cette portion est essentiellement ligamenteuse : des fibres longitudinales en limitent l'élongation tandis que des fibres spirales en provoquent la rotation de sa partie terminale. C'est ainsi que le demi-tour d'hélice vers la droite que connaît le pénis au cours de l'érection amène le processus urétral non plus directement en bas et dans l'axe du pénis mais latéralement et vers le haut au moment de l'éjaculation. L'extrémité du pénis présente une configuration anatomique fort variable d'une espèce à l'autre.

D'une longueur chez le taureau de 35 à 40 cm et d'un diamètre de 3 cm, le *fourreau* ou prépuce s'ouvre quelques cm en arrière de l'ombilic. Il comporte comme dans les autres espèces deux feuillets interne et externe séparés par une structure lamellaire. Celle-ci se met en place sous influence hormonale vers 32 semaines (4 à 9 mois) chez le taureau, au-delà de la 10^{ème} semaine chez le bélier, vers 20 semaines chez le verrat et vers 4 semaines chez l'étalon. C'est la présence de cette structure lamellaire qui permet au pénis de sortir lors de l'érection sur une longueur de 25 cm et parfois de 40 cm lors de l'éjaculation chez le taureau. La séparation de ces deux feuillets conduit à l'éversion du prépuce qui peut sortir même chez

l'animal au repos. Le système musculaire comporte des muscles crâniens fixés à l'appendice xiphoïde. Ils tirent vers l'avant et enserrant l'orifice préputial. En arrière, les muscles caudaux venant de la région inguinale contribuent lors du cabrer de l'animal à tirer le prépuce vers l'arrière et à faciliter la sortie du pénis. Le verrat possède un large diverticule dorsal préputial dans lequel s'accumulent urine et débris épithéliaux.

6.2. L'appareil génital externe

Cet examen se réalisera dans un endroit calme, bien éclairé voire chauffé. Il a pour but de vérifier la conformation du **scrotum**, la consistance et la mobilité de son contenu et son volume. Pour ce faire, le praticien se placera derrière ou à côté de l'animal. Le scrotum sera abordé progressivement pour habituer l'animal à la présence de la main et éviter une rétraction réflexe des testicules dans le scrotum. Cet examen sera complété par celui du fourreau et de son extrémité poilue (calculose).

Occasionnellement lors d'inflammation par exemple (posthite), le **prépuce** peut présenter des modifications de volume, de sensibilité ou de température. Chez le verrat, l'extrémité du fourreau renferme la bourse de Lacauchie.

L'**urètre** extra pelvien se palpe facilement en enfonçant les doigts, le pouce étant opposé aux autres doigts, au niveau du périnée 30 cm environ en dessous de l'anus. La seconde courbure de l'S pénien est ainsi palpée. La première courbure est palpée au-dessus des testicules près des anneaux inguinaux.

L'examen du **pénis** nécessite l'extériorisation naturelle ou manuelle. Celle-ci peut être obtenue par l'injection d'acépromazine (10 mg / 100 kgs) (la xylazine est inefficace). On observera ainsi sa couleur, sa longueur, la présence éventuelle de lésions (bride, tumeurs, adhérences..) ou de sécrétions anormales.

6.2.1. Conformation du scrotum.

Normalement, le scrotum comporte un rétrécissement au-dessus des testicules. Un aspect trop droit de cette zone de localisation du plexus pampiniforme peut interférer avec la thermorégulation du testicule et donc avec la spermatogenèse. Cette interférence peut également être constatée en cas de dépôt excessif de graisse dans le cordon testiculaire. Chez l'*étalon* en particulier on veillera à identifier la présence de cicatrices de castration éventuelle (diagnostic différentiel avec la cryptorchidie).

6.2.2. Palpation du contenu scrotal

Dans un second temps on procédera à la palpation du contenu scrotal à savoir le testicule mais aussi la queue, le corps et la tête de l'épididyme. Ces différentes structures présentent des variations interspécifiques de disposition, de volume et de poids (Tableau 6). Chez le *taureau*, chaque testicule sera d'une main maintenu au fond du sac scrotal tandis qu'il sera palpé de l'autre main pour en évaluer la consistance et la mobilité comme la souplesse et l'intégrité du sac scrotal. Chez le *verrat*, le scrotum est situé juste sous l'anus. Il est moins bien défini que dans les autres espèces animales et les testicules sont plus horizontaux. La contraction du cremaster fait prendre aux testicules une position plus verticale.

La consistance testiculaire se trouve diminuée lors de dégénérescence et augmentée en cas d'hypoplasie ou d'inflammations chroniques. Elle est habituellement plus nette chez les jeunes *taureaux*. De même, la mobilité des testicules peut être altérée par la présence d'adhérences ou de brides inflammatoires acquises ou congénitales plus localisées, de varicocèles, d'abcès, de dépôts de graisse.

Chez le *taureau*, un ou les deux testicules peuvent être localisés dans la partie supérieure du sac scrotal voire dans le trajet inguinal.

Normalement la palpation des testicules est indolore.

L'**épididyme** peut être dilaté en cas de spermastase ou douloureux en cas d'inflammation. La tête de l'épididyme sera plus aisément palpée chez certains *taureaux*. Le corps de l'épididyme est palpé en

position médiane plus aisément si le testicule contra latéral est repoussé vers le haut. La queue de l'épididyme est nettement proéminente à la base du testicule. Des différences de consistance et de taille entre la gauche et la droite peuvent indiquer un état inflammatoire. Des cas d'aplasie segmentaire uni ou bilatérale ont été décrits.

La palpation manuelle du scrotum est essentielle. Elle peut néanmoins être complétée par un examen échographique ou thermographique ou tonométrique (mesure indirecte de la consistance, méthode peu utilisée).

6.2.3. Biopsie testiculaire

Chez le *taureau* elle est d'utilisation difficile compte tenu de la richesse de l'albuginée en vaisseaux.

6.2.4. Détermination du volume scrotal

6.4.2.1. Intérêt de la méthode et facteurs de variation

Le volume scrotal est classiquement déterminé par la mesure du périmètre scrotal au moyen d'un ruban métrique. Ce paramètre revêt une importance pratique indéniable. En effet, il existe une corrélation étroite entre le périmètre (PS) et le poids des deux testicules (0.89) (Coulter et Foote, Theriogenology, 1979,11,297-311). De même, ce poids testiculaire est étroitement et directement corrélé avec la production journalière de sperme et sa qualité. On a également observé que ce paramètre à une valeur prédictive du moment d'apparition de la puberté supérieure à l'âge ou au poids et cela quelle que soit la race de l'animal. On a observé des coefficients de corrélation compris entre 0.66 et 0.97 entre le périmètre scrotal et les performances de reproduction (âge au premier vêlage, fertilité) de la descendance femelle des *taureaux*. Enfin, son héritabilité est comprise entre 0.3 et 0.7 selon les études (moyenne 0.4) et est plus constante que les caractéristiques de l'éjaculat.

Le volume testiculaire se calcule à partir du PS au moyen de la formule suivante :

$$V = 0.0396 \times \text{longueur} \times \text{PS}^2.$$

Le périmètre scrotal est essentiellement influencé par deux facteurs : la nutrition et la race.

La croissance testiculaire est maximale au moment de la puberté, celui-ci étant étroitement conditionné par la nature du régime alimentaire. On a observé qu'un régime riche en énergie administré depuis la naissance jusqu'à l'âge d'un an est sans effet sur la qualité du sperme. Il ne semble pas en être de même après cet âge. En effet, un tel régime est alors de nature à favoriser des troubles de la croissance, une augmentation du risque d'inflammation de la paroi du rumen, d'abcès hépatiques, d'adénites, d'épididymites et une diminution de la qualité du sperme (voir infra).

Il existe de larges différences du périmètre scrotal pour un âge donné entre les races de *taureaux*. En général, comme pour les femelles, les races connues pour leur potentiel laitier sont plus rapidement pubères et ont des testicules plus larges que les races à viande. Parmi ces dernières, l'héritabilité c'est-à-dire et notamment l'effet du père, a été observée (cfr infra). Cependant, une fois la puberté atteinte, il ne semble pas y avoir de différences entre races en ce qui concerne la capacité spermatogénique du testicule, celui-ci produisant quelque soit la race environ 17 millions de spermatozoïdes par gramme et par jour.

6.4.2.2. Méthode de détermination du périmètre scrotal

Chez le *taureau*, une fois le contenu scrotal palpé, les testicules sont positionnés fermement au fond des bourses testiculaires en appliquant une main au niveau des cordons testiculaires en évitant de placer l'un ou l'autre doigt entre les testicules. La pression ainsi exercée ne doit pas être excessive pour éviter un écartement anormal des testicules. Un mètre ruban est ensuite placé autour du plus grand diamètre des testicules et serré de manière telle qu'il assure un simple contact avec le scrotum. Certaines recommandations applicables à toutes les races ont été avancées : 20 cm à 7 mois, 32 cm à 12 mois, 33.5 cm à 18 mois et 35 cm à 24 mois (Hanset Publication Herd Book 2000 11-16). L'American Society for Theriogenology a récemment proposé (1997) des valeurs de C.S. égales à 30, 31, 32, 33 et 34 cm

respectivement pour des *taureaux* âgés de moins de 16 mois, de 16 à 21 mois, de 22 à 24 mois ou de plus de 24 mois. En première approche, et d'une manière très générale, un seuil de 32 cm peut être utilisé: l'atteinte de ce seuil à 12 mois peut être considéré comme très satisfaisant alors qu'une mesure inférieure à 2 ans permet de redouter des lésions d'hypoplasie ou de dégénérescence testiculaire (Ott 1987). Des valeurs de référence ont également été publiées pour les principales races françaises à partir de mesures établies en station (Tableau 1: Parez et Thibier 1983) (Tableau 2: Coulter et al. 1987). En race Blanc Bleu Belge, la mesure des périmètres du scrotum est systématiquement réalisée sur les taureaux en phase finale du performance test cad vers l'âge de 13 mois. Des valeurs comprises entre 20 et 40 cm ont été observées sur 947 taureaux provenant de 12 pères différents. Une valeur moyenne de 31.2 cm a été enregistrée à l'âge de 398 jours. Le poids moyen des taureaux était de 528 Kgs (357 à 730 Kgs). Des corrélations significatives entre la circonférence scrotale et le poids (0.312), la taille (0.286) et le gain quotidien (0.235) ont été déterminées. De même, il s'est avéré que le père avait également un effet significatif. Des valeurs comprises entre 33 cm (Taureaux Classique, Brulot) et 28 cm (Taureau Bison) ont été observées (Hanset Publication Herd Book 2000 11-16). Un effet "environnemental" est également possible puisque des différences ont pu être observées entre les stations de sélection de Ath et de Ciney.

Chez des animaux gras, une perte de poids excessive peut se traduire par une réduction du périmètre scrotal. De même, il a été observé qu'une dégénérescence testiculaire pouvait se traduire en une quinzaine de jours par une réduction de 2 à 4 cm du périmètre scrotal.

Chez le *bouc*, la circonférence scrotale est étroitement corrélée avec le poids du corps ainsi qu'avec le nombre total de spermatozoïdes présents dans l'éjaculat (Tableau 3).

6.3. L'appareil génital interne : la palpation transrectale°

L'examen de l'appareil génital interne est indispensable chez tout *taureau* ou *étalon* soumis à une évaluation de fertilité. Il a pour but d'évaluer le volume du cordon spermatique intra-abdominal, les dimensions de l'anneau inguinal, le volume, la fermeté et la sensibilité des glandes annexes ainsi que l'urètre.

Les **anneaux inguinaux** sont palpés chez le *taureau* 15 à 20 cm environ en contrebas du bord antérieur du bassin, et 5 à 15 cm par rapport au plan médian de l'animal. Un ou trois doigts peuvent le plus souvent y être introduits. Une augmentation de ce diamètre prédispose l'animal à la hernie scrotale pendant la saillie.

Les ampoules des canaux déférents sont peu palpables.

En cas d'inflammation, les **vésicules séminales** sont élargies et perdent leur aspect lobulé. Cette pathologie se rencontre plus fréquemment chez les jeunes individus. Un état inflammatoire se traduira par la présence dans un frottis spermatique d'un ou plusieurs neutrophiles par champ microscopiques (agrandissement 1000). Certaines anomalies congénitales ont été décrites : aplasie, hypoplasie, kystes. Un prélèvement des sécrétions vésicales (recherche bactériologique) peut être réalisé par aspiration en introduisant un cathéter dans le canal de l'urètre et en massant simultanément les glandes vésicales. L'identification d'*Actinomyces pyogenes* est la plus fréquente.

Les **glandes bulbo urétrales** sont enfouies dans le muscle du même nom et ne sont habituellement pas palpables. Chez le taureau, leur longueur est de 2 à 3 cm et leur épaisseur comprise entre 1 et 2 cm.

La **prostate** est palpée comme une zone légèrement épaissie située transversalement à l'extrémité antérieure de l'urètre.

La **portion intra pelvienne du pénis** est le plus souvent la structure la plus aisément palpée d'autant qu'à la palpation manuelle elle est le plus souvent pulsatile étant donné les contractions du muscle urétral qui entoure l'urètre..

6.4. Les prélèvements

Leur importance est réelle. En effet, les maladies vénériennes revêtent chez le mâle un caractère beaucoup plus subclinique que chez la femelle. Ces prélèvements sont réalisés directement ou par lavage de la cavité préputiale.

Le prélèvement direct s'effectue chez le *taureau* sur le pénis préalablement extériorisé ou à l'aide de

tampons de gaze fixés sur une tige rigide pour en permettre l'introduction dans la cavité préputiale. On lui préfère le plus souvent le prélèvement indirect. Cette méthode est réalisée par injection de 50 à 100 ml de sérum physiologique ou de milieu de culture dans le fourreau au moyen d'une canule plastique (30 cm). L'orifice préputial est rasé et lavé. La canule est introduite d'une main au fond de la cavité tandis que la seconde obture l'extrémité du fourreau. Ce dernier est ensuite massé d'arrière en avant pour que le liquide en atteigne les différentes parties. Le flacon est abaissé et le liquide recueilli par gravitation.

6.5. Les examens complémentaires

6.5.1. L'endoscopie

L'endoscopie est utilisée chez l'étalon.

6.5.2. L'échographie

Les mesures prises par échographie sont en ce qui concerne les glandes accessoires 80 % inférieures à celles obtenues après abattage des animaux. La raison peut en être trouvée dans l'effet des muscles striés entourant la plupart de ces glandes. *Les glandes bulbourethrales* apparaissent hyperéchogènes et ovoïdes. Leur périphérie constituée d'une capsule apparaît à l'échographie comme une zone plus blanche. Les contractions du muscle bulbospongieux sont responsables des variations de diamètre observées. La *prostate* apparaît hyperéchogène au niveau du col de la vessie. Son corps est constitué de deux lobes d'un cm environ. L'image échographique est rectangulaire avec des bords sombres et une image interne d'un gris homogène parsemée de petites zones plus anéchogènes de type liquidien. Selon l'incidence, il est possible d'identifier sous la prostate les conduits excréteurs des vésicules séminales. Les *ampoules des canaux déférents* sont rondes ou ovales en section transversale. Elles sont entourées d'une couche musculaire, grisâtre à l'échographie. Leur lumière anéchogène représente 10 à 60 % de leur diamètre total. Les *vésicules séminales* se trouvent latéralement à proximité du col de la vessie. De forme irrégulière, souvent en S, elles se présentent sous la forme de zones hyperéchogènes séparées par des zones moins échogènes. Elles sont entourées par une membrane nettement plus échogène.

L'image échographique du parenchyme des *testicules* apparaît homogène et moyennement échogène. Le corps d'Highmore, zone (centrale chez le taureau mais plus périphérique chez l'étalon) de convergence des tubes séminifères est plus échogène et en particulièrement visible en coupe longitudinale sous la forme d'une zone blanchâtre d'une épaisseur de 2 à 4 mm. La tunique vaginale n'est identifiable que lors de l'accumulation de liquides en excès (hydrocèle par exemple). Le plexus pampiniforme se présente sous la forme de structures tubulaires circonvoluées anéchogènes (coupes dans l'artère et veine testiculaire) au-dessus du pôle dorsal du testicule. Le canal déférent n'y est pas identifiable. La queue et la tête de l'épididyme sont visibles par échographie. Le corps de l'épididyme et le canal déférent, sont plus difficiles à identifier. (Référence : Ginther O.J. Ultrasonic imaging and animal reproduction in cattle. Book3 Equiservices publishing 1998.)

7. Méthodes de récolte du sperme

La récolte du sperme constitue la première opération de l'insémination artificielle et/ou de son examen. Le vagin artificiel constitue le moyen classiquement utilisé quelque soit l'espèce animale. L'électro-éjaculation est également d'application dans les espèces bovine, ovine, canine et les volailles. Il est également possible chez la jument de recueillir le sperme directement dans le vagin. Enfin, citons pour mémoire la récolte de sperme par massage des vésicules séminales chez le *taureau*.

7.1.1. Le vagin artificiel

Appareil simple et pratique, le vagin artificiel comporte deux parties. Un cylindre extérieur en matériel rigide le plus souvent en caoutchouc dur et épais (isolation thermique) ou en plastique muni d'une ouverture fermée par un *bouchon*. Sa longueur est d'environ 34 cm et son diamètre externe compris entre 6 et 8 cm. La chemise intérieure en latex ou en caoutchouc artificiel est introduite dans le cylindre

externe et ses extrémités rabattues et maintenues par un élastique. La cavité ainsi formée par le cylindre externe et la chemise interne est remplie d'eau à 41-42°C en quantité suffisante pour obtenir une pression équivalente à celle du vagin de la femelle. Une extrémité du vagin artificiel est lubrifiée : elle servira à introduire le pénis ; sur l'autre est fixée un cône en caoutchouc au bout duquel est adapté un tube en verre ou mieux en plastic gradué pour recueillir le sperme. Certains vagins artificiels sont équipés d'un thermomètre.

7.1.1.1. Taureau

Le vagin artificiel comporte trois parties : une partie externe rigide d'un diamètre de 6.5 cm et une longueur comprise entre 26 et 40 cm selon l'âge de l'animal ; une partie interne constitué d'un manchon en caoutchouc de 50 cm de long et un cône récepteur en caoutchouc sur lequel sera fixé le tube collecteur. L'ensemble sera fixé au moyen de deux lanières en caoutchouc. Si le vagin choisi n'est pas adapté, il risque de le blesser, souillant ainsi le prélèvement ou entraînant un risque de refus de l'animal pour les prélèvements ultérieurs. Dans cette espèce, la température de l'eau de remplissage (40°C) est plus importante que la pression. Aussi est-il recommandé de maintenir si possible le vagin dans une étuve à 45°C et ne le remplir que dans les minutes précédant le prélèvement. Une surpression est déconseillée car elle risque de ne pas laisser au pénis une place suffisante lors de l'éjaculation et d'entraîner un éclatement de la paroi interne et donc une contamination du prélèvement par de l'eau. Un remplissage correct se traduit lorsque l'ouverture du vagin en position verticale simule une fente vaginale.

La récolte se fera autant que possible dans un endroit calme pour éviter toute situation stressante à l'animal et sur un sol non glissant et non pulvérulent (contamination du prélèvement) pour assurer un saut optimal de l'animal et le confort de l'opérateur.. Le recours à un animal bête en train est préférable mais non indispensable. Cet animal sera idéalement placé dans un travail de contention dégageant l'arrière train. Les centres d'insémination utilisent des mannequins (vache mécanique). Une vache peut être utilisée. L'inconvénient est le risque de saillie naturelle. Sa résistance dépendra de son état de chaleurs. Un mâle peut être utilisé pour des animaux entraînés.

On veillera à réaliser le prélèvement dans de bonnes conditions hygiéniques : lavage de l'extrémité du fourreau, désinfection du vagin artificiel...

Deux à trois fausses montes seront réalisées avant le prélèvement proprement dit. Elles sont de nature à améliorer les principales caractéristiques du sperme (volume, nombre de spermatozoïdes vivants) et à augmenter l'état d'excitation du *taureau*.

Lors du cabrer de l'animal, le pénis sera dirigé au moyen de la main appliquée sur le fourreau vers l'ouverture du vagin artificiel celui-ci étant dirigé de bas en haut selon un angle de 45° et légèrement vers l'extérieur. L'excitation sensorielle de la chaleur humide entraîne le réflexe d'intromission dans un puissant coup de rein qu'accompagne l'opérateur. L'éjaculation proprement dite est le plus souvent immédiate, rapide et même parfois brutale. Sitôt après, le *taureau* redescend. Une fois le prélèvement réalisé, le vagin est retourné de manière à recueillir le sperme dans le tube de récolte. Ce dernier sera le cas échéant protégé d'un choc thermique éventuel par de l'ouate, du tissu ou une autre enveloppe isolante thermique. Lors du prélèvement, on évitera toute déviation excessive du pénis.

Habituellement, deux prélèvements seront réalisés au cours de la même séance.

7.1.1.2. Bélier

Le type de vagin artificiel est comparable à celui utilisé chez le *taureau* mais est de dimensions plus réduites. Sa température doit se situer entre 41 et 44°C. L'animal de monte peut être une brebis en chaleurs ou non, un *bélier* ou une brebis traitée aux œstrogènes. Les *béliers* peuvent être entraînés à donner du sperme en-dehors de la période de reproduction proprement dite. Trois à huit éjaculats espacés de 15 minutes peuvent être ainsi recueillis en une journée.

7.1.1.3. Bouc

La température du vagin artificiel sera de 44-45°C. Le temps nécessaire à l'obtention d'un éjaculat varie avec les individus. Les mâles de bonne ardeur sexuelle peuvent donner deux éjaculats au cours de la

même séance.

7.1.2. L'électro-éjaculation

7.2.1.1. Taureau

Peu utilisée, la méthode est le plus souvent appliquée aux animaux qui faute d'érections normales, de lésions articulaires ou du refus du vagin artificiel ne peuvent être récoltés au moyen d'un vagin artificiel. Utilisé pour la première fois par Eckart chez le chien en 1863, le procédé fut amélioré par Laplaud et Cassou en 1945.

L'électro-éjaculation consiste à provoquer l'émission de sperme par l'excitation électrique des nerfs érecteurs et éjaculateurs. Elle est réalisée sur animal debout ou couché.

L'appareillage comporte une sonde rectale de forme ogivale munie d'électrodes bipolaires parcourues d'un courant d'intensité moyenne mais de bas voltage, alimentées par batterie ou par secteur au moyen d'un transformateur, ce dernier permettant d'avoir une tension constante. Le rhéostat permet de faire varier les caractéristiques du courant de manière à obtenir le cycle nécessaire à l'obtention de l'écoulement du sperme. Les impulsions électriques de 0.3 A durent 1.5 sec et sont espacées de périodes de repos de 1.5 sec. Le voltage est progressivement augmenté de 6 à 21 volts au bout d'une trentaine d'impulsions. Un second cycle est ensuite éventuellement recommencé selon les réactions présentées par l'animal et notamment, la contraction des crémasters et la remontée des testicules voire de faibles contractions du train postérieur. La durée totale est comprise entre 5 et 10 minutes et le volume collecté entre 10 et 30 ml. Cependant, il est préférable de régler l'intensité et la fréquence des stimulations en observant le comportement de l'animal et de son appareil reproducteur.

Il existe divers types d'électroéjaculateurs. Leur choix dépend largement de préférences personnelles. On se souviendra néanmoins que les sondes de large diamètre induisent une plus forte réponse à la stimulation pour une impulsion électrique donnée que les sondes de petit diamètre. Il semble que pour les *taureaux* pesant entre 550 et 900 kgs des sondes de diamètre compris entre 6.5 et 7.5 cm constituent un compromis idéal. Les sondes modernes comportent trois électrodes séparées d'un cm et situées sur la partie ventrale de la sonde. La disposition des électrodes tout autour de la circonférence de la sonde (anciens modèles) entraînerait une stimulation excessive des muscles du train postérieur. Ces sondes devraient être introduites dans le rectum en deux temps : sur 2/3 de leur longueur environ jusqu'au moment où le pénis s'extériorise et complètement ensuite pour induire l'éjaculation.

L'animal sera placé dans un travail de contention. L'extrémité du fourreau sera nettoyée et ses poils coupés pour éviter toute contamination. Une palpation manuelle du rectum permet de le débarrasser de ses matières fécales, de masser les vésicules pour en extraire partiellement le liquide séminal et de préparer ainsi l'animal aux stimulations électriques. Un drainage du rectum au moyen de 2 à 3 litres d'eau salée facilite l'évacuation du rectum et augmente le contact entre l'électrode et la paroi rectale. La sonde est lubrifiée au moyen de vaseline et progressivement introduite dans le rectum. Lors des 10 premières impulsions, une fraction liquide transparente peut être observée. C'est le liquide séminal qui n'est le plus souvent pas recueilli. La fraction devient ensuite plus crémeuse. Elle est collectée au moyen d'une éprouvette placée au bout d'un entonnoir fixé à un manche. Au besoin, le pénis sera sorti pendant les stimulations en repoussant vers l'avant la courbure sigmoïde. Le cas échéant, son extrémité peut être saisie pour récolter le sperme. Cette façon de faire permet de contrôler les stimulations sur le pénis.

Les qualités du sperme recueilli ne sont pas modifiées par le type de prélèvement utilisé. Un volume plus important de sperme est habituellement recueilli par électroéjaculation. L'aptitude à la congélation et le pouvoir fécondant sont comparables. La tranquillisation préalable de l'animal avant la stimulation réduit les chances de prélèvement.

Le vagin artificiel augmente le risque de lésions de la verge. Le problème majeur de l'électroéjaculateur réside dans le fait que 25 % des jeunes *taureaux* et 2 % des *taureaux* âgés de plus de deux ans s'affaiblissent en cours de prélèvement suite à la tétanisation des membres postérieurs.

L'investissement d'un vagin artificiel est 5 fois moindre que celui d'un électroéjaculateur.

7.2.1.2. Bélier

Le *bélier* répond très bien et plus rapidement que le *taureau* à la méthode de collecte par électroéjaculation. L'animal est maintenu debout ou couché sur une table. Le pénis et son appendice terminal filiforme sont extériorisés et introduits dans le tube de récolte avant que ne survienne l'éjaculation qui en général apparaît au bout de trois à quatre stimulations de 2 à 8 volts.

7.2.1.3. Autres espèces

Chez le *verrat*, l'isolation graisseuse et la nécessité de hauts voltages entraînent des réactions défavorables pour l'animal ce qui explique le peu d'utilisation de la méthode dans cette espèce. Le cas échéant, elle nécessitera son anesthésie générale.

La méthode a également été appliquée chez le chat.

7.1.3. Autres méthodes

Le massage transrectal du tractus génital interne a été proposé comme méthode chez le *taureau*. Cette méthode est indiquée pour des animaux présentant des lésions de l'appareil locomoteur. Si au bout de 2 à 3 minutes, aucun résultat n'est obtenu, il faut envisager une autre méthode.

Le massage mécanique du fourreau et du pénis est d'application chez le chien.

8. Examen du sperme

L'évaluation de la qualité du sperme d'un animal vise en fait à rencontrer trois objectifs : le premier est d'identifier les animaux infertiles, le second est d'évaluer la fertilité d'un animal antérieurement infertile et le troisième à détecter les animaux dont la fertilité est supérieure. En pratique, seuls les deux premiers objectifs sont susceptibles d'être atteints, étant donné la multiplicité des facteurs responsables du troisième.

La fertilité d'un mâle dépend de la capacité de celui-ci à former un nombre suffisant de spermatozoïdes qui seront déposés au moment optimal et à l'endroit anatomique optimal du tractus génital femelle pour optimiser leur contact avec l'ovocyte, en permettre la fertilisation et le développement embryonnaire.

Deux types de facteurs séminaux sont susceptibles d'interférer avec la fertilité d'un mâle compte tenu de l'interaction existante entre la quantité et la qualité d'un sperme. Certains défauts qualitatifs peuvent être compensés par une augmentation de la quantité de sperme. Ainsi en est-il de leur mobilité qui si elle est insuffisante les empêche d'atteindre l'endroit de fécondation, de leur durée de vie voire de certaines anomalies morphologiques. D'autres au contraire ne peuvent être compensés. Ils sont associés à l'incapacité du spermatozoïde à féconder l'ovocyte ou à permettre le développement des premiers stades embryonnaires. La plupart des anomalies morphologiques appartiennent à cette catégorie.

La connaissance du mécanisme de transport du sperme dans les voies génitales femelles permet de mieux appréhender les relations existantes entre la qualité du sperme et la fertilité. Deux phases doivent être distinguées dans la migration du sperme vers l'endroit de fécondation. La première phase d'une durée de quelques minutes fait directement suite à l'insémination. Elle concerne essentiellement les spermatozoïdes non viables. La seconde est plus soutenue et dure environ 6 heures. Elle concerne davantage les spermatozoïdes viables. En effet, le col, les cornes utérines et la jonction utéro-tubaire voire l'ovocyte exercent un certain rôle de filtre à l'encontre des spermatozoïdes anormaux, non viables.

Classiquement, la détermination de la qualité du sperme suppose le prélèvement préalable et ensuite l'évaluation de divers paramètres d'examen macroscopique, microscopique ou biochimique de valeur inégale dont seule la concordance permet de tirer des conclusions valables.

8.1. Examens macroscopiques

8.1.1. Volume

La quantité de sperme varie selon les espèces et pour une espèce donnée, selon l'état physiologique de l'individu, l'âge, la saison, les méthodes de récolte, la race ou encore les conditions sanitaires et alimentaires.

On distingue habituellement les espèces à insémination de type utérin (cheval, porc, chien) et les espèces de type vaginal (ruminants, lapin). Chez les premières, le sperme est abondant et peu concentré tandis que l'inverse est vrai pour les espèces du second groupe. Le tableau 4 en présente les caractéristiques pour différentes espèces

8.1.2. Aspect et consistance

Le sperme normal est un liquide crémeux, épais, légèrement jaunâtre ou grisâtre selon les espèces consistant en une suspension de spermatozoïdes dans le plasma séminal. Il devient plus clair au fur et à mesure que sa concentration en spermatozoïdes diminue.

Le sperme du *taureau* et du *bélier* est de consistance laiteuse et de coloration blanchâtre. Le sperme de *bélier* est blanc crémeux, plus dense et plus opaque que celui du *taureau*.

8.1.3. Couleur

Le plus souvent blanchâtre, la couleur des spermes peut être modifiée pour des raisons physiologiques (concentration) mais le plus souvent pathologiques. Certains *taureaux* ont un sperme de couleur jaunâtre imputable à la présence d'un lipochrome provenant des vésicules séminales et dont la présence est sans rapport avec l'alimentation. Cette couleur jaune peut également résulter de la présence de pus ou d'urine ce qui compromet le pouvoir fécondant du sperme. La coloration rosée ou rougeâtre résulte de la présence de sang ou peut faire suite à l'administration prolongée de phénothiazine. Quelques gouttes ou ml de sang peuvent parfois apparaître à la fin de l'éjaculation. Elles disparaissent le plus souvent spontanément et n'interfère pas avec la fécondation. Leur présence résulte vraisemblablement de ruptures de micro vaisseaux. Le plus souvent la présence d'éléments figurés du sang n'interfère pas avec la fertilité étant donné la présence dans le plasma séminal d'hémagglutinines qui éliminent ces corps étrangers par agglutination. La coloration brunâtre témoigne de la présence d'éléments sanguins dégénérés. La coloration bleuâtre résulte d'une faible concentration ou de l'administration de bleu de méthylène.

8.1.4. Viscosité, pH et poids spécifique

La **viscosité** dépend de la concentration en spermatozoïdes. Comparée à l'eau distillée (1), la viscosité du sperme de *taureau* est de 3.7. Elle dépend également de sa conductibilité électrique c'est-à-dire de sa concentration en ions.

La mesure du **pH** (pHmètre, papier indicateur) doit être immédiate, le sperme s'acidifiant rapidement étant donné la formation d'acide lactique. Sa valeur normale doit être comprise entre 6.5 et 6.8. D'une manière générale, les spermes forts concentrés et riches en fructose accusent une diminution plus rapide du pH que les autres du fait de l'accumulation plus rapide d'acide lactique due à une glycogénolyse plus intense ce qui indirectement témoigne leur meilleure qualité.

Le **poids spécifique** dépend du rapport entre la concentration en spermatozoïdes et le volume du plasma séminal. Il est de 1.035 chez le *taureau*.

8.1.5. Recherche des polynucléaires

Il est possible de réaliser sur le sperme le test de Schalm (CMT Californien Mastitis Test). Pour ce faire 0.5 ml de sperme sera mélangé à 2.5 ml de Teepol. Le degré de gélification sera noté comme pour le

lait.

8.2. Examen microscopique du sperme

Comme son nom l'indique, cet examen fait principalement appel au microscope. Il existe néanmoins d'autres méthodes moins classiques pour compléter la collecte d'informations permettant de procéder à une évaluation aussi précise que possible de la qualité d'un éjaculat. Le lecteur intéressé consultera avec profit une synthèse parue sur ce sujet (Garner D.L. Ancillary tests of bull semen quality. Vet.Clinics North Amer.Food, Anim.Pract., 1997,13,313-330.).

L'examen microscopique sera réalisé autant que faire se peut dans les minutes suivant le prélèvement et selon la nature des examens microscopiques en respectant les conditions thermiques optimales. Il est également possible de conserver à plus long terme (1 mois) un échantillon de sperme en en diluant 0.5 à 1 ml dans une solution saline et formolée avant son stockage au réfrigérateur (Solution de Hancock) (Tableau 5).

L'examen microscopique permettra et notamment de poser le diagnostic de l'une ou l'autre anomalie dont il est important de rapporter les définitions. On parlera d'*asthénospermie* ou d'asthénozoospermie si la motilité individuelle est inférieure à 30 % ou si la note de motilité massale est inférieure à 2. On parlera d'*azoospermie* en cas d'absence de spermatozoïdes dans l'éjaculat. On parlera de *nécospermie* si l'on observe une proportion élevée de spermatozoïdes morts. L'oligospermie traduit une concentration faible en spermatozoïdes ($< 300.000 / \text{mm}^3$). La *teratospermie* ou teratozoospermie traduit la présence d'une proportion élevée en spermatozoïdes anormaux ($> 30 \%$).

8.2.1. Détermination de la motilité massale

L'emploi du terme motilité et non mobilité signifie que les spermatozoïdes se meuvent par eux-mêmes et ne se déplacent pas passivement. Motilité est la traduction littérale de l'anglais motility.

La motilité du spermatozoïde est due à la contraction du filament axial. L'examen de la motilité doit se faire le plus rapidement possible après le prélèvement en le maintenant rigoureusement à une température voisine de 38°C. La progression des spermatozoïdes est habituellement rectiligne. Au cours de leur déplacement, ils subissent une rotation autour de leur grand axe. Dans la queue de l'épididyme, les spermatozoïdes sont immobiles. Leur motilité dépend de leur présence dans un milieu de pH et de température normale, renfermant en quantités adéquates nutriments et ions, conditions offertes une fois qu'ils sont présents dans les sécrétions séminales. On comprend ainsi aussi pourquoi leur motilité peut facilement être inhibée en cours de prélèvement par la présence de contaminants chimiques sur les lames, ou d'urine. La motilité massale dépend essentiellement de trois facteurs : la concentration, le pourcentage de spermatozoïdes mobiles et de la vitesse de déplacement des spermatozoïdes. Ils doivent être pris en considération dans l'interprétation du score de la motilité massale.

Chez le *taureau*, l'intensité et le nombre des mouvements se traduisent par de véritables vagues observables après dépôt d'une goutte de sperme sur une lame préchauffée et son examen au faible grossissement (40 à 125) si possible au moyen d'un microscope à contraste de phase. Sur une échelle d'évaluation de 1 à 4, un sperme de très bonne qualité (4) montre des tourbillons noirs et rapides. S'il est de bonne qualité (3), ces tourbillons seront moindres et plus clairs. S'il est de qualité correcte, les tourbillons ne sont plus visibles et on devine la présence d'une mobilité individuelle (2). S'il est enfin de mauvaise qualité, il n'y a plus voire presque plus de mobilité individuelle (1). Il n'est habituellement pas nécessaire de poursuivre les examens si le sperme a une mobilité massale de 1. A l'inverse, en cas d'absence de mobilité massale, l'examen doit être complété par l'examen de la mobilité individuelle. En général, on a tendance à sous-estimer une bonne mobilité massale et à la surestimer quand elle est mauvaise. L'examen de la motilité massale ne donne qu'une idée fort approximative du pourcentage de spermatozoïdes mobiles. Mieux vaut donc recourir à l'examen de la motilité individuelle.

8.2.2. Détermination de la motilité individuelle

L'examen de la motilité individuelle ("progressive motility") sera préférentiellement réalisé une fois après dilution (10 à 40 fois) du sperme dans un dilueur ("extender") ou dans du sérum physiologique préalablement chauffé. Ces milieux seront idéalement préparés avant l'examen pour éviter toute

modification de pH, préjudiciable à la motilité des spermatozoïdes. Le récipient sera placé sur une plaque chauffante. La motilité sera déterminée au moyen d'un microscope à contraste de phase en plaçant une goutte de sperme entre lame et lamelle. Trois à cinq champs proches du centre de la goutte, seront ainsi examinés au grossissement 200 à 500 et la moyenne calculée. La motilité d'un spermatozoïde peut être considérée comme bonne quand il traverse la champ du microscope relativement rapidement avec des mouvements de rotation de la tête (spermatozoïdes fléchants ou traceurs). Certains (50 %) spermatozoïdes présentent des mouvements circulaires imputables à l'implantation abaxiale de leur queue. D'autres se déplacent de manière curviligne ou plus lentement. Les analyseurs d'image de type CASA (Computer Assisted Sperm Analysis) permettent de quantifier de manière plus précise (la nature et la vitesse des déplacements).

Un sperme de très bonne qualité (4) doit posséder au moins 80 à 100 % de spermatozoïdes mobiles. Un sperme de bonne qualité (3) aura 60 à 79 % de spermatozoïdes mobiles. Un sperme de qualité correcte (2) aura 40 à 59 % de spermatozoïdes mobiles et enfin un sperme de faible qualité (1) aura moins de 40 % de spermatozoïdes mobiles.

L'examen de la motilité individuelle est intéressant car elle fournit indirectement des informations intéressantes sur l'intégrité de la membrane du spermatozoïde et son intégrité morphologique. Ainsi un pourcentage élevé de spermatozoïdes mobiles joint à un pourcentage élevé de spermatozoïdes morts donnera à penser à une mauvaise manipulation du sperme plus qu'à un sperme anormal. De même une faible motilité est souvent corrélée avec un pourcentage élevé de formes anormales ou de spermatozoïdes morts.

8.2.3. Détermination de la concentration

La concentration exprime le nombre de spermatozoïdes par mm³.

Elle peut être déterminée directement par comptage des spermatozoïdes au moyen d'une cellule hématimétrique ou indirectement par comparaison visuelle du sperme à des solutions standard, par comptage électronique ou encore par néphélométrie (ou néphélémétrie). Cette méthode est universellement utilisée dans les centres d'IA. Elle consiste à apprécier la concentration en spermatozoïdes en évaluant l'opacité de la suspension au moyen d'un spectrophotomètre ou d'un colorimètre. Cette opacité peut cependant être indirectement augmentée suite à la présence de débris cellulaires. Cette méthode est moins exacte chez les espèces dont le plasma séminal présente de grandes variations d'opacité (*verrat, étalon*). La cellule de Thomas (hemocytomètre) offre le double avantage être bon marché et de voir les spermatozoïdes.

La numération directe se fait au moyen d'un hématimètre. Ce type de numération suppose la dilution préalable du sperme dans une solution susceptible de disperser et de tuer les spermatozoïdes : solution de chlorure de sodium à 3 % ou solution de formaldéhyde à 1 % (solution de Hancock). Le taux de dilution dépend de la concentration apparent du sperme. On conseille une dilution de 1 % pour les spermes de *taureau*, de *bélier* et de *bouc*.

Il existe différents types d'hématimètre qui se caractérisent notamment par leur surface (S) et la profondeur de leur chambre de numération (P) : Malassez (S: 5 mm², P: 0.2 mm), Thoma (S: 1 mm², P: 0.1 mm), Neubauer (S: 9 mm², P: 0.1mm) et Türk (S: 9 mm², P: 0.1 mm). L'hématimètre est constitué d'une lame de verre, creusée d'une petite cuvette dont le fond est garni d'un quadrillage. La cellule de Thoma comporte un quadrillage de 16 grands carrés comprenant chacun 16 petits carrés. La surface des grands carrés est égale à 1 mm². La chambre de numération a une hauteur de 0.1 mm.

Après dépôt d'une goutte de sperme et son recouvrement par une lamelle, le nombre de spermatozoïdes est déterminé au grossissement 10 x 40 sur une surface correspondant à 4 grands carrés. Par convention, on ne prend en compte que les têtes des spermatozoïdes situés à l'intérieur des deux lignes parallèles délimitant chaque grand carré ou dont la tête se trouve sur les lignes gauche et supérieure délimitant un grand carré. Le calcul de la concentration se fait de la manière suivante :

$$\text{Concentration} = N \times 4 \times 10 \times D$$

- N est le nombre de spermatozoïdes comptés dans 4 grands carrés (pour le vertrat les

spermatozoïdes sont le plus souvent dénombrés sur 10 grands carrés et la règle de trois est appliquée pour compter les spermatozoïdes sur l'ensemble des carrés).

- 4 puisque l'hématimètre comporte 16 grands carrés d'une surface totale égale à 1 mm²
- 10 puisque la hauteur de la chambre de numération est égale à 0.1 mm
- D c'est-à-dire le degré de dilution

8.2.4. Examen morphologique

8.4.2.1. Quelques rappels

a. La spermatogenèse

La transformation d'une spermatogonie en spermatozoïde (*spermatogenèse*) comprend trois étapes se déroulant histologiquement de la membrane basale vers la lumière du tube séminifère.

La *spermatocytogenèse* assure par un processus mitotique dont le nombre est variable selon les espèces la transformation d'une spermatogonie A (chromatine poussiéreuse) en spermatogonie B (chromatine croutelleuse) puis en spermatocyte 1. Cette phase dite de multiplication a une durée d'une douzaine de jours. Elle se déroule essentiellement au niveau de la membrane basale.

Le spermatocyte 1 subit alors entre les cellules de Sertoli une phase de division méiotique qui aboutit après 15 à 17 jours à la formation de deux spermatocytes secondaires chacun d'entre eux se divisant en spermatide.

La *spermiation* constitue la phase de différenciation (14 étapes) de la spermatide en spermatozoïde au niveau des cryptes du tube séminifère. Elle est suivie de la libération du spermatozoïde dans la lumière du tube séminifère.

En moyenne une spermatogonie aboutit à la formation de 256 spermatozoïdes.

Ces différents stades de la spermatogenèse présentent deux caractéristiques qui sont d'une part les associations cellulaires et d'autre part le cycle de développement. A un endroit donné du tube séminifère, la succession des divers stades de développement ne se présente pas au hasard mais sous la forme d'*associations cellulaires* dont deux principaux types ont été décrits l'une basée sur la morphologie générale des cellules concernées (12 types d'associations chez le taureau), l'autre plus couramment utilisée basée sur les caractéristiques générales de l'acrosome des spermatides (8 types d'associations cellulaires chez le taureau). La notion de vague implique la distribution le long du tube séminifère de l'ensemble des associations cellulaires en un instant donné. Elle revêt une connotation spatiale. Il s'agit d'un panoramique du tube séminifère. Chaque association cellulaire ne renferme pas le même nombre de cellules. Ainsi, les groupes 1 à 6 en comprennent 5 et les groupes 7 à 12 en renferment 4. Chaque association cellulaire évolue de manière synchrone. La notion de *cycle* exprime le temps nécessaire (jours) pour qu'à un endroit donné du tube séminifère se retrouve la même association cellulaire. Il s'agit de la juxtaposition de photos prises au même endroit du tube séminifère. Elle revêt à la différence de la notion de vague une connotation temporelle. La durée de ce cycle est variable selon les espèces. Il est de 13,4 jours chez le *taureau*, de 12 jours chez l'*étalon*, 10 jours chez le *bélier* et de 9 jours chez le *verrat*. La durée d'un cycle est quelque soit l'espèce égale au quart environ de la durée totale nécessaire à la formation d'un spermatozoïde. Ainsi la durée de la spermatogenèse est de 56, 48, 40, 36 jours respectivement pour le *taureau*, l'*étalon*, le *bélier* et le *verrat*.

Le tableau 6 synthétise les principales caractéristiques spermatogéniques de différentes espèces animales. On observera une fois comparée la production journalière en spermatozoïdes des deux testicules (DSP : Daily Sperm Production) et le nombre total journalier de spermatozoïdes qui peuvent être journellement récoltés (DSO : Daily Sperm Output). En général, il y a peu de pertes de spermatozoïdes à l'exception toutefois du *bélier* dont l'urine renferme beaucoup de spermatozoïdes. D'autres facteurs peuvent contribuer à expliquer cette différence : volume des réserves extra gonadiques (différentes parties de l'épididyme, canal déférent), importance de la résorption, masturbation c'est-à-dire en fait la fréquence des éjaculations.

Le déplacement du sperme dans l'épididyme a une durée comprise entre 8 et 11 jours. Il résulte de la

poussée exercée par les spermatozoïdes produits, de la résorption par la tête de l'épididyme des sécrétions testiculaires (rete testis), phénomène qui contribue à augmenter la concentration des spermatozoïdes, des mouvements propres des spermatozoïdes mais aussi des contractions péristaltiques du canal déférent. C'est au cours de son trajet épидидymaire que le spermatozoïde subit divers changements de maturation le rendant aptes à la fécondation : acquisition de sa motilité, condensation nucléaire et modification de la forme de l'acrosome, modification de la surface de la membrane plasmique, migration de la gouttelette cytoplasmique (excès de cytoplasme expulsé lors de la spermiogenèse) d'une position proximale vers une position distale au niveau de la pièce intermédiaire...

On le constate, la spermatogenèse est un processus d'une grande complexité soumis à l'influence de nombreux facteurs qu'ils soient génétiques ou environnementaux. Le spermatozoïde peut être considéré comme une biopsie du tissu testiculaire. Son examen morphologique permet de mieux identifier le caractère normal ou non de la spermatogenèse. Celle-ci est surtout influencée par deux groupes de facteurs les uns liés à la température, les autres au stress. D'autres facteurs moins communs sont parfois impliqués ; facteurs génétiques : certains *taureaux* et leur descendance génèrent de manière répétée des spermatozoïdes anormaux ; facteurs nutritionnels : ils s'exercent directement ou indirectement via la synthèse des gonadotropines. Ont ainsi été impliquées les carences en vitamine A; B, E ou en zinc. Les nitrofuranes et le gossypol se sont également révélés toxiques pour les spermatozoïdes ; l'âge exerce également un effet non négligeable. La **puberté** a été définie comme l'âge auquel l'éjaculat renferme 50 millions de spermatozoïdes dont 10 % étaient motiles. En moyenne la puberté est acquise entre 35 et 49 semaines. Elle est plus précoce chez les *taureaux* laitiers que viandeux.

La température exerce un effet non négligeable sur la spermatogenèse. Les testicules localisés dans le scrotum sont à une température qui en moyenne est inférieure de 2 à 7°C à celle du corps. Cet abaissement de la température testiculaire est assuré par le plexus pampiniforme. Tout effet extérieur contribuant à augmenter la température du testicule est susceptible d'interférer avec la fertilité via une réduction de la mobilité du sperme, une augmentation de la fréquence des formes anormales au bout d'une dizaine de jours compte tenu de la durée du transport dans l'épididyme. Ainsi en est-il de facteurs tels que l'orchite, la fièvre, une hyperthermie environnementale ou le dépôt de graisse au niveau inguinal ou du scrotum. De même, la spermatogenèse étant sous le contrôle des gonadotropines, on ne peut négliger l'impact de facteurs physiologiques ou pathologiques régissant la synthèse de ces hormones via une libération de corticoïdes (stress, boiteries, tumeurs...).

b. Morphologie du spermatozoïde

Le spermatozoïde normal se compose essentiellement d'une tête, d'un col et d'un flagelle. Il présente des caractéristiques propres à chaque espèce (Tableau 7). La tête est de forme et de dimensions variables selon les espèces : allongée chez le *taureau* (9.5 sur 5.5 microns), en massue chez le *bélier* (9 sur 5 microns), le *bouc* (8 sur 5 microns). Comprenant essentiellement le noyau, la tête est recouverte sur ses deux tiers de l'acrosome renfermant dans sa partie antérieure l'hyaluronidase, enzyme chargé de "digérer" le matériel unissant les cellules du cumulus oophorus ovocytaire et dans sa partie postérieure, l'acrosine impliquée dans la pénétration de l'ovocyte par le spermatozoïde. Le *col* est une région complexe située entre les deux centrioles. Le *flagelle* comprend la pièce intermédiaire débutant au niveau du centriole distal ; elle constitue la pièce motrice proprement dite, de la pièce principale qui en est la portion la plus longue et de la pièce terminale.

8.4.2.2. Principes généraux

L'examen morphologique nécessite la coloration du sperme. Pour ce faire, une goutte de sperme est déposée à l'extrémité d'une lame et étendue en couche mince au moyen d'une autre lame inclinée à 45°. La préparation est séchée à l'air libre en quelques minutes. Le frottis est ensuite fixé par immersion dans une solution d'alcool méthylique ou dans une solution de formaline à 5 %. La fixation à l'air libre est également possible comme celle consistant à passer rapidement le frottis au-dessus d'une lampe à alcool. Tout choc thermique sera néanmoins évité pendant ces préparations. Les éjaculats trop

concentrés seront avantageusement dilués. Certaines colorations ont pour objet de mieux faire apparaître la morphologie du spermatozoïde (coloration totale), les autres dites vitales permettent de différencier les spermatozoïdes morts et vivants.

Parmi les *colorations totales*, certaines sont dites simples (encre de Chine, bleu de méthylène, bleu de toluidine, violet de gentiane, fuschine...) : elles fournissent une coloration uniforme des spermatozoïdes tandis que les secondes dites double (Giemsa, Williams) et font mieux apparaître les différences structurales au niveau de la tête, de l'acrosome ou de la pièce intermédiaire. La coloration à l'encre de Chine est dite négative car les spermatozoïdes apparaissent en clair sur le fond noir de l'encre de Chine. La préparation en est simple : le frottis réalisé au moyen du mélange d'une goutte de sperme et d'une goutte d'encre de Chine est laissé sécher à l'air libre. Cette coloration identifie bien la forme de la tête ainsi que la présence éventuelle d'une gouttelette protoplasmique.

La *coloration vitale* a pour principe d'utiliser un colorant qui ne traverse que les membranes des cellules mortes (éosine, rose Bengale, vert de Crésyl) et un colorant de fond qui facilite la lecture (bleu de méthylène, nigrosine). La coloration éosine-nigrosine est classiquement utilisée. On évitera la formation d'artefacts en respectant les principes suivants : éviter tout choc thermique en opérant à 37°C (platine chauffante, étuve thermostatique) ; utiliser des colorants en solution isotonique de pH égal à 6.8, standardiser la durée de la coloration, employer un mélange sperme-colorant compris entre 1/1 et 1/20.

Préparation de la solution éosine-nigrosine

- Eosine 3.3 g
- Nigrosine 20.0 g
- Citrate de sodium 1.5 g (pour réduire l'effet hypotonique du colorant vital)
- Eau distillée : 300 ml
- Mélanger et chauffer la solution jusqu'à dissolution
- Ajuster le pH à 6.8-7 si nécessaire
- Laisser reposer quelques jours, filtrer et maintenir au réfrigérateur.

Remarque : la nigrosine se dilue mieux dans de l'eau à 40°C.

Principe de la coloration vitale à l'éosine-nigrosine

- Solution d'éosine-nigrosine maintenue au réfrigérateur
- Placer huit gouttes de la solution dans un tube au bain-marie à 37°C
- Placer deux gouttes de sperme dans le même tube
- Agiter
- Après 5 minutes d'équilibration, faire un frottis sur une lame à 37°C
- Sécher la préparation aussi vite que possible pour réduire l'effet du choc hypotonique induit par le colorant

Remarque : il existe de nombreuses variations de ce protocole portant sur les doses, les concentrations et les temps de contact différents.

La dilution préalable du sperme (2 gouttes dans 0.5 ml de sérum physiologique ou de dilueur) en facilitera l'examen morphologique. Une goutte de sperme dilué et coloré sera placée à l'extrémité d'une lame chauffée pour en faire l'étalement. Cela permet d'obtenir par champ microscopiques 15 à 25 spermatozoïdes, nombre optimal pour en faire l'analyse morphologique. Dans ces conditions en effet, le fond du frottis est suffisamment coloré et permet de bien distinguer les spermatozoïdes. Si le sperme est particulièrement dilué, il faudra centrifuger préalablement le prélèvement. L'examen sera idéalement réalisé avec un objectif à immersion et au grossissement 1000 à 1250. 100 spermatozoïdes seront comptés voire plus si le nombre de spermatozoïdes est plus important.

Les spermatozoïdes morts seront colorés en rouge, l'éosine y ayant pénétré étant donné les

modifications de perméabilité membranaire.

La coloration vitale à base d'éosine, nécessite l'utilisation d'une concentration élevée de ce colorant (10 mg/ml) pour évaluer en microscopie optique l'exclusion du colorant. A cette concentration, l'éosine est toxique et ce faisant entraîne une sous-évaluation de la proportion des cellules vivantes. Le recours à des fluoro-chlorés tel que le colorant Hoechst 33258 constitue une méthode alternative qui réduit le risque d'altération des spermatozoïdes. Le fluorochrome se fixe spécifiquement sur l'ADN (De Leeuw et al. J.of Andrology, 1991,12,112-118 ; Tshering et al. Elevage et Insémination, 1992,6,249).

8.4.2.3. Anomalies morphologiques

Les anomalies morphologiques des spermatozoïdes peuvent être dites primaires (1) si elles trouvent leur origine pendant la phase de spermatogenèse (testicule) ou secondaires (2) si elles surviennent pendant leur phase de maturation (épididyme) (Tableau 8). La majorité des lésions du spermatozoïde sont dites primaires. Certaines peuvent être à la fois primaires et secondaires comme la présence de gouttelettes, les têtes sans queue. Les lésions du spermatozoïde peuvent également être qualifiées de majeures ou de mineures selon qu'elles exercent ou non un effet négatif sur la fertilité. Enfin, elles peuvent concerner isolément ou simultanément les diverses parties du spermatozoïde.

La tête peut présenter des anomalies de forme, de dimensions, de duplication, de position ou de structure de l'acrosome.

Les anomalies du col intéressent l'implantation de la queue, les têtes sans queue ou la persistance de la gouttelette protoplasmique. Le lecteur intéressé consultera avec profit le livre « Abnormal morphology of bovine spermatozoa » de Barth AD et Oko RJ, Iowa State University Press, 1989.

La notion d'anomalies peut également se concevoir en terme de capacité ou non pour le spermatozoïde d'atteindre l'endroit et d'assurer la fécondation de l'ovocyte (compensable trait) et/ou d'assurer la fécondation de l'ovocyte mais aussi les premiers stades du développement embryonnaire (uncompensable trait).

Au nombre des premiers on peut noter une concentration insuffisante de l'éjaculat d'un taureau, facteur qu'il est possible de compenser en augmentant la concentration de la paillette par exemple.. Au nombre des seconds on peut noter des éjaculats normaux mais renfermant une proportion trop importante de spermatozoïdes porteurs de vacuoles nucléaires (cratères ou diadèmes). Leur utilisation s'accompagne d'une réduction du taux de fertilisation et d'une diminution de la qualité des embryons (Miller et al. Theriogenology 1982, 17,611 ; DeJarnette et al. J.Anim.Sci., 1992, 70,484 ; Saacke et al. J.Anim.Sci., 1992, 70,256 abs).

a. Anomalies de la tête

- Lésion en bouton de l'acrosome (Knobbed acrosome defect)

Cette anomalie s'identifie sur base de l'observation d'un aplatissement ou d'un découpage anormal de la courbure de l'acrosome. Cette anomalie apparaît pendant la spermiogenèse. Un grossissement x 1000 est nécessaire à son identification. Cette anomalie semble être liée à un gène autosomal récessif. Elle exerce un effet négatif majeur sur la fertilité.

- Tête piriforme ou fuselée

C'est une des anomalies de la tête la plus fréquemment rencontrée (10 % des taureaux de 2 à 12 ans concernés). Le plus souvent, l'aspect piriforme résulte de l'aspect plus effilé de la zone postacrosomique, la zone acrosomiale étant par ailleurs normale. Le rétrécissement concerne parfois tout à la fois la zone acrosomiale et postacrosomiale. L'hérabilité de ce type d'anomalie ainsi que ses effets négatifs sur la fertilité ont été démontrés.

- Vacuoles nucléaires (spermatozoïde en diadème)

Cette anomalie consiste en la formation de vacuoles unique ou multiples, de taille variable dans le

noyau. Elles sont localisées à l'apex ou se rassemblent en un diadème à la jonction acrosomique et postacrosomique. Une coloration Feulgen du noyau et un grossissement x 1000 en facilitent l'identification. Ces vacuoles résultent de l'invagination de la membrane nucléaire dans le cytoplasme.

- Condensation anormale du DNA

Cette anomalie peut s'identifier après une coloration du spermatozoïde par le colorant de Feulgen. La chromatine nucléaire se présente sous la forme de zones régulièrement et irrégulièrement colorées. Rarement décrite, cette anomalie a un effet majeur sur la fertilité.

- Tête détachée

L'identification d'un faible pourcentage (5 %) de têtes sans queue est classique. L'augmentation de ce pourcentage (> 30 voire 40 %) a été associée à de l'hypoplasie ou de la dégénérescence testiculaire ou à une inflammation des glandes annexes. Empêchant le déplacement normal du spermatozoïde elle est responsable d'infertilité.

- Micro et macrocéphalie

Cette anomalie résulterait d'une distribution anormale des chromosomes lors de la division méiotique. Ces spermatozoïdes meurent le plus souvent avant d'avoir atteint le stade de spermatide. Elle serait sans effet sur la fertilité.

b. Lésions de la queue

La majeure partie de ces lésions concerne la pièce intermédiaire. Celles relatives à la pièce principale de la queue consistent en la présence de temps à autre de *boucles* et autres enroulements possibles de cette partie de la queue. Elles résultent le plus souvent des préparations du frottis comme par exemple l'exposition prolongée du sperme à des solutions hypotoniques. Il ne semble donc pas qu'elles aient une connotation pathologique importante.

- Courbure de l'extrémité distale de la pièce intermédiaire (DMR : Distal midpiece reflex)

Chez le *taureau*, elle constitue l'anomalie la plus fréquente de la queue. Elle affecte pratiquement tous les *taureaux* dans toutes les races. L'incidence de cette anomalie est comprise entre 23 et 55 %, 8 % en moyenne des *taureaux* examinés étant touchés.

La pièce intermédiaire a une forme typique en J ou en bâton de berger. D'autres formes sont également possibles dont celle où la pièce intermédiaire est recourbée à 180°. Habituellement, on peut observer une gouttelette cytoplasmique au niveau de la courbure néoformée. Il en résulte une orientation anormale du flagelle et une progression du spermatozoïde à contre-courant. Il ne semble pas cependant qu'une telle anomalie puisse engendrer de manière permanente de graves problèmes de fertilité.

- Lésion dite de Dag (Dag defect)

Le signe majeur de cette lésion concernant la partie intermédiaire de la queue consiste en la rupture ou fracture de ses éléments constitutifs. Il en résulte son aspect spiralé voire plissé à distinguer du DMR. Cette lésion serait due à un gène récessif.

- Gouttelettes cytoplasmiques

Les gouttelettes cytoplasmiques (2 à 3 microns) peuvent être localisées en position proximale près de la tête du spermatozoïde ou en position distale au bout de la pièce intermédiaire. Cette lésion est très fréquente. Lors de la spermatogenèse, la majorité du cytoplasme nucléaire est enlevé par les cellules de Sertoli. Il peut cependant arriver que lors de la spermiation, une partie de ce cytoplasme demeure accroché au niveau de la pièce intermédiaire. Cette gouttelette migre lors du transit épидидymaire d'une position proximale vers une position distale puis est libérée avant l'éjaculation. La présence de gouttelettes proximales a été associée à un trouble de la spermatogenèse et celle d'une gouttelette distale à celui de la maturation. Cette anomalie est plus fréquente chez les animaux jeunes. Chez les adultes, elle peut être induite par un trouble de la thermorégulation testiculaire. Une fréquence de 5 à

10 % de cette anomalie est susceptible d'entraîner des troubles de la fertilité. La gouttelette proximale est souvent associée à d'autres anomalies.

- Implantation abaxiale de la queue

Elle ne semble pas selon certains auteurs devoir être considérée comme une anomalie au sens strict puisque étant sans effet sur la fertilité mais comme une particularité morphologique. Elle est parfois associée avec la présence d'une queue accessoire.

- Queue en moignon

Un examen attentif de la base de la tête fait voir un petit bout de queue. La difficulté de l'identification de cette anomalie l'a souvent confondue avec celle d'une tête sans queue. Le sperme des *taureaux* atteints est souvent peu concentré et le pourcentage de spermatozoïdes mobiles faible. Cette anomalie a également été décrite chez l'homme et l'*étalon*. Cette lésion semble être irréversible. La cause n'en est pas connue.

- Pièce intermédiaire en U ou en arc-en-ciel

Il semblerait que cette anomalie traduise simplement la perte de mobilité par un spermatozoïde, ce dernier dessinant une large courbe avant de mourir...

- Pièce intermédiaire en tire-bouchon

Rare cette anomalie résulte d'une dégénérescence ou d'une aplasie de l'enveloppe mitochondriale de la pièce intermédiaire, conséquence possible d'une dégénérescence testiculaire.

8.2.5. Examen bactério-virologique

Il doit être réalisé lorsque l'on suspecte une infection du tractus génital et plus spécialement lorsque le sperme est pollué par des polynucléaires. Normalement le sperme est stérile mais il peut être contaminé par les conditions de la récolte. Au nombre des germes saprophytes on note *Bacillus subtilis*, *Corynebacterium*, *Enterocoques*, *Proteus*, *Entérobactéries*. L'identification d'un germe ne le rend pas nécessairement responsable de l'affection. L'examen doit être corrélé avec les autres examens macroscopiques et microscopiques.

8.2.6. Examens complémentaires

La glycolyse et la respiration constituent les deux principales activités métaboliques des spermatozoïdes. Elles sont étroitement dépendantes de la concentration et de la motilité des spermatozoïdes. En l'absence d'oxygène, les spermatozoïdes trouvent leur principale source d'énergie dans le métabolisme des hydrates de carbone et du fructose notamment, présent en grandes concentrations dans les vésicules séminales. L'index de fructolyse se définit comme la quantité de fructose (mg) utilisée par un milliard de spermatozoïdes en une heure à 37°C. Sa valeur normale est comprise entre 1.4 et 2.

D'autres tests complémentaires peuvent être réalisés en vue d'évaluer l'intégrité de la membrane plasmique (coloration à l'éosine-nigrosine, au moyen de fluorochromes, test hypo-osmotique), de l'acrosome (examen direct ou indirect après induction de la réaction acrosomiale), du noyau (test de décondensation de la chromatine).

8.3. Interprétations

L'appréciation de la fonction sexuelle du *taureau* est réalisée de manière fort différente selon la catégorie à laquelle il est susceptible d'appartenir : taureau de monte naturelle (1), taureau destiné tardivement à l'insémination (2), taureau de la filière insémination artificielle (3).

8.3.1. Taureaux de monte naturelle

Ils utilisent par femelle inséminée plusieurs milliards de spermatozoïdes non congelés. Ce sont le plus souvent des taureaux de race à viande. Leur puberté est le plus souvent tardive. Le volume de l'éjaculat n'est pas un facteur critique ; Il est compris entre 1 et 10 ml. La concentration du sperme doit être

supérieure à 300.000 spermatozoïdes par mm^3 si la récolte a été effectuée au moyen d'un vagin artificiel voire inférieure si la récolte a été obtenue par électroéjaculation. Une note de motilité massale supérieure ou égale à 2 est acceptable. Elle est étroitement dépendante de la concentration et donc de la méthode de récolte. Le pourcentage de spermatozoïdes mobiles doit être supérieur à 30. La morphologie est indépendante de la méthode de prélèvement. Par contre elle est d'autant plus altérée que le taureau est jeune ou que le repos sexuel a été prolongé avant le prélèvement. Le pourcentage de formes anormales dépend également de la méthode d'examen. On acceptera 40 % de spermatozoïdes anormaux lors d'un examen en microscopie à contraste interférentiel et 25 % lors d'examen sur frottis. Un périmètre scrotal supérieur à 32 cm à 12 mois autorise un pronostic reproducteur favorable.

8.3.2. Taureaux destinés tardivement à l'insémination artificielle

Ces animaux ont le plus souvent réalisé avant une carrière en monte naturelle. Leur semence doit être congelable. Pour être compatible avec la congélation, les paramètres suivants doivent être respectés : au moins 500.000 spermatozoïdes par mm^3 , 60 % de motilité et au moins 3 pour la note de motilité massale. Ces critères autoriseront une dilution au $10^{\text{ème}}$ et la préparation de doses renfermant 30.000 spermatozoïdes par mm^3 soit 50 fois moins que dans le sperme pur.

8.3.3. Taureaux de la filière insémination artificielle

On réalisera une première récolte dès l'âge de 10 à 11 mois sur les taureaux de race laitière tandis que les taureaux dits mixtes ou à viande seront d'abord évalués sur leurs performances de croissance en station.

Le rythme hebdomadaire des récoltes est d'une récolte de deux sauts ou de deux récoltes à un seul saut afin de pouvoir évaluer au moins dix récoltes en terme de libido, volume, motilité, concentration, morphologie, congélabilité. Les taureaux sont le plus souvent éliminés avant la fin de l'évaluation s'ils refusent de sauter, s'ils présentent de l'azoospermie, de l'asthénospermie, si leur motilité individuelle est inférieure à 60 %, si leur motilité massale est inférieure à 3, leur concentration inférieure à 500.000 et le % de formes anormales supérieure à 30 %. En fait le plus souvent, ces animaux sont évalués en lots au sein desquels ils sont comparés dans le but de sélectionner les meilleurs et d'éliminer les plus mauvais. Cette sélection phénotypique se trouve notamment justifiée par le fait qu'elle a abouti à une augmentation de la concentration moyenne du sperme en spermatozoïdes (700.000 à 1.300.000 spermatozoïdes en 13 ans)

9. Pour en savoir plus

- Crabo BG Reproductive examination and evaluation of the boar. In Current therapy in large animal theriogenology. Youngquist. RS, Saunders Company 1997.
- Barth AD et Oko RJ Abnormal morphology of bovine spermatozoa » de, Iowa State University Press, 1989.

10. Tableaux

Tableau 1 : Circonférence scrotale de quelques races françaises

Races	N	C.S. 12 mois (cm)	C.S. 15 mois (cm)
Frisonne Pie Noire	74	34	35
Normande	26	33	35
Montbéliarde	103	34	36
Abondance	18	34	36
Blonde d'Aquitaine	59	33	34

Tableau 2 : Recommandations de la CS de quelques races bovines (Coulter GH et al. 1987, Coulter GH Proc.Soc.Theriogenol.,1991,113-116)

Races	12 à 14 mois	15 à 20 mois	21 à 30 mois	> 30mois
Charolais	32	34	35	36
Limousin	30	32	33	34
Maine Anjou	32	34	35	36
Blonde d'Aquitaine	30	32	33	34
Salers	30	32		
Angus	32	34		
Gelbvieh	33	35		
Simmental	33	35		
Hereford	31	33		
Shorthorn	31	33		

Tableau 3 : Valeurs du périmètre scrotal chez le *bouc* (Données évaluées à partir de 122 animaux d'animaux croisés)

Poids du corps	Périmètre scrotal Moyenne	Périmètre scrotal Ecart
4.4	6.8	4.9-7.9
7.6	11.0	7.1 - 17.5
12.0	15.9	10.5 - 19.8
17.3	18.3	11.9 - 21.0
22.0	20.8	16.2 - 22.3
27.5	21.5	17.7 - 24.4
32.7	23.3	19.5 - 26.8
37.3	25.0	23.0 - 27.0
43.9	26.4	24.8 - 28.4

Tableau 4 : Principales caractéristiques du sperme de quelques espèces animales

Espèce	Volume (ml)	Concentration (nb spz/mm ³ : x 1000)
Taureau	5 (2 à 15)	800 à 1000
Bélier	0.8 (0.5 à 2)	2000 à 3000
Etalon	100 (40 à 320)	50 à 150
Verrat	200 (100 à 500)	50 à 150

Tableau 5 : Composition de la solution de Hancock

Composants	Quantités (g)
Na ₂ HPO ₃ 2H ₂ O	6.19 (4.95 g de matière sèche)
KH ₂ PO ₄	2.54
Na Cl	5.41
Formaldéhyde 38 %	125 ml
Eau distillée	1000 ml

Tableau 6 : Principales caractéristiques de la spermatogenèse de quelques espèces animales

Caractéristiques	Taureau	Bélier	Etalon	Verrat
Poids de l'animal	1200	100	1000	200
Poids des deux testicules	800	500	340	720
Production / jour en spz (x 1000) des deux testicules	7700	9800	8000	16000
Production / jour en spz (x 1000) par g de tissu testiculaire	12	19	21	29
Récolte journalière potentielle en spermatozoïdes (x 1000)	7200	5500	7000	16000
Durée du transit épидидymaire (jours)	7 à 13	13 à 17	4 à 6	9 à 14
Total des réserves extra gonadiques (x1.000.000.000)	69	> 165	77	> 185
Tête de l'épididyme	19	23	9.6	36
Corps de l'épididyme	4.7	11	11	51
Queue de l'épididyme	38	126	50	104
Canal déférent	7.6	-	7.5	-

Tableau 7 : Tailles des spermatozoïdes dans différentes espèces animales (microns)

	Taureau	Bélier	Etalon	Verrat
Longueur totale	65 à 80	75 à 80	55 à 60	50 à 58
Longueur de la tête	9	9	7	8
Largeur de la tête	4	5	4	4
Longueur de la pièce intermédiaire	10	14	8 à 10	10
Longueur de la pièce principale et terminale	50	40 à 45	41 à 42	30 à 38

Tableau 8 : Principales anomalies morphologiques des spermatozoïdes

Lésions majeures	
Tête	Queue
Lésion en bouton de l'acrosome	Gouttelette cytoplasmique proximale
Aspect piriforme	Enroulement total
Vacuoles nucléaires (lésion en diadème)	Aspect en tire-bouchon
Absence de queue	
Lésions mineures	
Tête	Queue
Micro et macrocéphalie	Gouttelette cytoplasmique distale
	Extrémité de la queue recourbée
	Implantation abaxiale