

TRAVAUX PRATIQUES EN THERIOGENOLOGIE



Pour les étudiants de 3^{ème}, 4^{ème} et 5^{ème} année docteur vétérinaire

Par

Prof. Sana HIRECHE

Année universitaire : 2022 – 2023

AVANT-PROPOS

Ce manuel constitue un outil pédagogique pour l'enseignement pratique de quelques aspects de la thériogénologie.

Les séances de travaux pratiques de thériogénologie représentent un moment privilégié de l'enseignement de cette discipline. Ils constituent un outil efficace de fixation des savoirs acquis lors des cours magistraux. Totalisant 12 semaines, les TP de thériogénologie s'organisent en 4 cycles.

Le module **physiologie de la reproduction**, en parallèle à ces enseignements à la paille, est un apport méthodologique pratique essentiel, tant les notions qui y sont abordées sont indispensables à la pratique en thériogénologie.

La rencontre avec les enseignants durant les travaux pratiques se déroule dans un cadre différent de l'amphithéâtre. Cela permet des discussions autour de la matière, ainsi que la mise en perspective de certaines pratiques en fonction des intérêts scientifiques des apprenants.

Les manipulations sont réalisées en binôme dans le premier et le deuxième cycle et concernent la technique de collecte de sperme épидидymaire, l'examen de la semence, la technique d'écouvillonnage vaginal, la réalisation des frottis vaginaux et leur interprétation dans la détermination du stade du cycle œstral des femelles domestiques, particulièrement la chienne.

Les deux séries de TP suivantes sont réalisées à la ferme expérimentale de l'Institut des Sciences Vétérinaires de Constantine. Les techniques qui y sont abordées sont la palpation transrectale et l'échographie de l'appareil génital de la vache.

La rédaction d'un compte rendu est impérative à l'aboutissement de chaque cycle de TP.

TECHNIQUES A REALISER ET COMPETENCES ACQUISES :

- Collecte du sperme épидидymaire.
- Réalisation d'un spermogramme.
 - Examen de la mobilité massale des spermatozoïdes.
 - Examen de la mobilité individuelle des spermatozoïdes.
 - Réalisation de la coloration MGG.
 - Examen de la morphologie des spermatozoïdes.
 - Comptage des spermatozoïdes sous microscope et calcul de la concentration du sperme à l'aide de l'hématimètre de Thoma.
- Ecouvillonnage vaginal.
- Réalisation et interprétation des frottis vaginaux.
- Palpation transrectale de l'appareil génital de la vache.
- Détermination du stade du cycle œstral chez la vache.
- Echographie de l'appareil génital de la vache.
- Constat de la gestation chez la vache.
- Détermination de l'âge du fœtus bovin par palpation transrectale.
- Détermination de l'âge du fœtus bovin par échographie.
- Diagnostic des pathologies utérines et ovariennes.

TP 1 : COLLECTE ET ANALYSE DU SPERME EPIDIDYMAIRE DES RUMINANTS

Public cible : Etudiants de troisième, quatrième et cinquième année docteur vétérinaire.

1. Introduction

Le recueil du sperme épидидymaire est une nouvelle biotechnologie de la reproduction employée lors de l'insémination artificielle (IA) ou de la fécondation in vitro (FIV) chez les ovins, les cervidés, les félidés etc. En effet, le sperme épидидymaire est une source importante de spermatozoïdes qui permet de préparer plusieurs dizaines de doses d'IA ou de FIV.

Technique d'actualité, cette dernière vise principalement la récolte du sperme épидидymaire dans un but de sauvegarde des espèces ou des races en déclin. Elle permet d'envisager aussi l'utilisation d'animaux non collectables (vivants ou morts depuis quelques jours).

Le sperme épидидymaire se conserve plusieurs jours à 4°C dans l'organe ou dans le milieu épидидymaire non dilué. La fertilité du sperme épидидymaire diminue en fonction du temps mais est encore utilisable après 72 heures de conservation, la fertilité étant alors encore égale à environ la moitié de la fertilité initiale.

2. Préalable (s) :

- Anatomie et physiologie de l'appareil génital mâle.

3. Objectifs d'apprentissage :

A l'issue de ce TP, l'apprenant devra être capable de :

- Décrire les méthodes de prélèvement du sperme épидидymaire.
- Maîtriser la technique de collecte du sperme épидидymaire de testicules de ruminants post-mortem.
- Enoncer les divers paramètres de l'examen macroscopique du sperme des ruminants.
- Enoncer les caractéristiques macroscopiques normales du sperme des ruminants.
- Enoncer les divers paramètres de l'examen microscopique du sperme des ruminants.
- Enoncer les caractéristiques microscopiques normales du sperme des ruminants.
- Enoncer la concentration normale en spermatozoïdes du sperme des ruminants.
- Citer les principales anomalies des spermatozoïdes.

4. Domaines d'application :

Le présent TP traite des analyses de sperme collecté par technique d'aspiration visant à évaluer la semence. Le spermogramme permet d'évaluer la qualité de la semence au niveau macroscopique et microscopique. Celle-ci est fortement corrélée à sa fertilité, sa survie dans les voies génitales femelles et sa résistance aux différentes techniques de conservation dont la congélation.

Le prélèvement de sperme de l'épididyme est une technique très intéressante dans le cas d'une blessure grave compromettant la capacité de se reproduire de l'animal, ou encore en cas de castration pour des raisons médicales ou de décès. Elle est pratiquée dans l'espèce équine et également chez les chiens et les félins. Cela permet de conserver le sperme d'animaux de grande valeur génétique (notamment réalisée chez les félins sauvages). En effet, la semence récupérée par flush épидидymaire est capable de féconder des ovocytes in vitro (Zambelli et Cunto, 2006 ; Korochkina et al., 2014).

On peut réaliser le prélèvement jusqu'à douze heures post-mortem sur des animaux conservés au froid (environ 4 à 6 °C). Actuellement, certains propriétaires et éleveurs souhaitent conserver le sperme de leurs animaux post-castrations ou post-mortem pour obtenir de nouvelles descendance (Bruemmer, 2006).

Il est également possible de prélever du sperme épидидymaire du vivant de l'animal sous anesthésie locale ou générale par une microponction du canal déférent et l'introduction d'une canule dont l'extrémité est conduite à l'extérieur à travers le scrotum pour la collection du sperme dans une petite fiole.

5. Technique de prélèvement du sperme épидидymaire en post-mortem :

Le TP est réalisé sur des testicules de taureau ou de bélier récupérés de l'abattoir tôt le matin juste après l'abattage. Chaque épидидyme est disséqué du testicule. La queue et le canal déférent sont isolés et les spermatozoïdes peuvent être récupérés en utilisant deux méthodes : la **méthode de flottaison** et la **technique de flush rétrograde**.

Dans la **technique de flottaison** encore appelée **méthode d'incision**, l'épididyme caudal et le canal déférent sont incisés à plusieurs endroits, lavés avec 2.5 ml de solution (alcool à 70°) chauffée à 37°C et suspendus dans un dilueur pour semence, ce qui permet la diffusion des spermatozoïdes dans le dilueur en une dizaine de minutes environ.

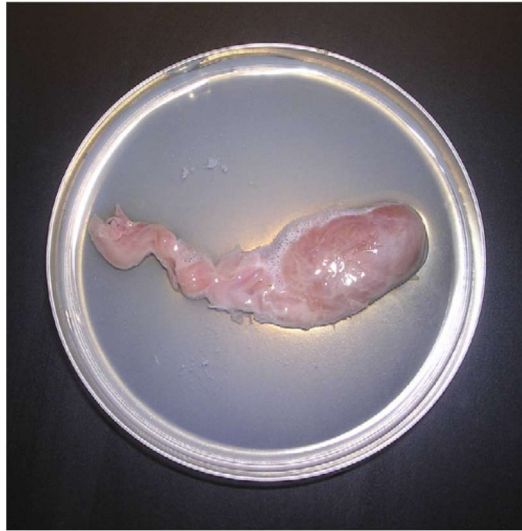


Figure 1 : Technique de flottaison pour la récolte du sperme épидидymaire (Bruemmer, 2006).

Dans la technique de flush rétrograde, le contenu de la lumière du tubule épидидymaire est recueilli en perfusant de l'huile de paraffine ou d'une solution de chlorure de sodium (NaCl) dosé à 0,9 % à partir du canal déférent à l'aide d'une aiguille maintenue par un clamp. Le sperme est collecté en incisant l'organe au niveau de la moitié de la partie caudale de la queue de l'épididyme.



Figure 2 : Perfusion de la partie caudale de l'épididyme de bélier (technique de flush rétrograde).



Figure 3 : Testicules ovins et section de la queue de l'épididyme (Marata et al., 2017).

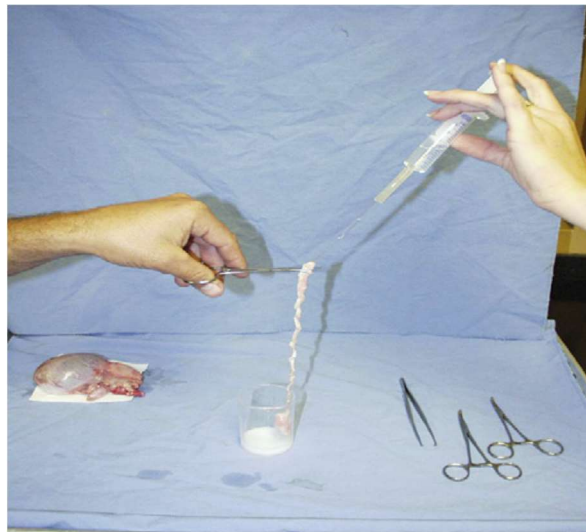


Figure 4 : Technique de collecte du sperme épидидymaire de flush rétrograde (Bruemmer, 2006).

6. Examen macroscopique du sperme

6.1. Volume

Le volume moyen de sperme épидидymaire pouvant être collecté est de 0.64 ml pour le taureau charolais et de 0,5ml pour le taureau limousin (Bencheikh et Kebbi, 2013). Ces volumes sont de l'ordre de 0,83ml selon Goovaerts et al. (2006). Alapati et al. (2009) rapporte un volume moyen de 4,86 ml par méthode de collecte par mouvement rétrograde (le volume de la semence pure en plus du liquide de rinçage).

6.2. Couleur

Le sperme est un liquide épais, clair, crémeux et de couleur variable suivant les espèces : blanchâtre chez le taureau, le chien et les rongeurs, blanc jaunâtre chez le béliet et le bouc, blanc laiteux ou grisâtre chez le verrat et l'étalon. L'opacité est fonction de la concentration

spermatique. Ainsi, chez le verrat, la couleur la plus blanche représente la plus forte concentration.

6.3. Viscosité

La viscosité du sperme total dépend de la concentration en spermatozoïdes, de la charge et, de la conductibilité électrique. La viscosité du sperme du bouc est bien supérieure à celle du taureau. Le poids spécifique du sperme est aussi directement proportionnel à la concentration en spermatozoïdes. La formation d'un filament glaireux à l'extrémité de la pipette signifie une pathologie.

6.4. pH

La mesure du pH peut se faire à l'aide d'un papier pH ou d'un pH-mètre. Le pH du sperme est proche de la neutralité. Un pH inférieur à 6.5 ou supérieur à 8 a comme conséquence la diminution de la plupart des paramètres (paramètres cinétiques, viabilité, activité mitochondriale, et morphologie) (Contri et al., 2012).

Tableau 1 : Valeurs de pH du sperme chez quelques espèces.

	TAUREAU	BELIER	VERRAT	ETALON
pH	6.5 – 6.9	5.9 – 7.3	7.3 – 7.9	6.2 – 7.8

7. Examen microscopique

7.1. Mobilité ou motilité des spermatozoïdes

7.1.1. Mobilité massale

Sur une goutte de sperme (5 µl) déposée sur une lame et observée à faible grossissement (x 100) on observe les mouvements des spermatozoïdes. Ils forment des « vagues » à la surface de la goutte.

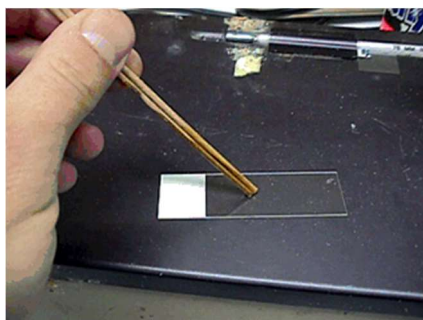






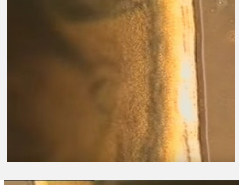

Figure 5 : Dépôt d'une goutte de sperme sur lame pour examen de la mobilité massale.

L'intensité des vagues est évaluée. Une note de 0 à 5 est attribuée à l'échantillon. Cette observation dépend à la fois des mouvements des spermatozoïdes et de la concentration de l'échantillon. Il s'agit d'une méthode subjective, la note de 0 à 5 est semi-quantitative. L'opérateur doit être expérimenté.

Consultez la ressource suivante afin de visualiser les vidéos correspondantes à chaque score de notation de la mobilité massale.

Ressource : <https://www.youtube.com/watch?v=fy1F7GAydn0>

Tableau 2 : Echelle d'appréciation de la motilité massale du sperme.

NOTE	ASPECTS DU MOUVEMENT	
0	Absence de mouvement	
1	Mouvements individualisés	
2	Mouvements d'ensemble circulaires très lents	
3	Mobilité massale générale de faible amplitude	
4	Mobilité massale rapide, sans tourbillons	
5	Mobilité massale rapide, avec tourbillons	

7.1.2. Mobilité individuelle

Le principe est d'examiner, à fort grossissement (x 400), une goutte de sperme déposée sur une lame et recouverte d'une lamelle. Le sperme doit être relativement peu concentré, afin que chaque spermatozoïde soit individualisable. Il est possible de le diluer dans une solution de NaCl isotonique tiédie à 37°C. Le pourcentage de spermatozoïdes mobiles est évalué de façon subjective. Les spermatozoïdes progressant en ligne droite (mobilité fléchante) sont distingués des spermatozoïdes tournant en rond, à mobilité faible ou diminuée.

7.1.2.1. La mobilité simple :

On considère tous les spermatozoïdes plus ou moins mobiles par opposition aux immobiles. Deux comptages sont réalisés par observation de quatre champs microscopiques à fort grossissement (X 400). Celle-ci s'exprime en pourcentage (note de 0 à 100%) et reflète partiellement la qualité du sperme (sperme de bonne qualité : **plus de 70% de spermatozoïdes mobiles**).

7.1.2.2. La mobilité progressive :

Elle permet d'affiner le déplacement réel des spermatozoïdes. La vitesse de progression est appréciée subjectivement par l'opérateur dans le champ de vision du microscope. Les spermatozoïdes peuvent avoir des mouvements oscillants (ils vibrent et n'ont pas de direction définie) et des mouvements fléchants (ils se déplacent de façon rapide et en ligne droite). Sur une échelle de 1 à 5, on classe les spermatozoïdes en fonction de leur mouvement.

Tableau 3 : Note d'appréciation subjective de la mobilité progressive des spermatozoïdes dans un échantillon (Fontbonne, 1992).

NOTE	INTERPRETATION
0	Pas de mouvement
1	Mouvements oscillants légers sans progression
2	Mouvements oscillants et progression faible et intermittente
3	Mouvements oscillants fléchant et progression lente régulière
4	Mouvements fléchant et progression régulière vers l'avant
5	Mouvements fléchant avec progression rapide vers l'avant

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.

Une diminution du pourcentage de spermatozoïdes mobiles peut aussi représenter un indicateur précoce mais non spécifique d'une infection du tractus génital.

L'évaluation de la mobilité au microscope est simple, rapide et peu onéreuse. Elle est cependant très subjective et présente d'importantes variations en fonction de l'opérateur (30 à 60%). Les biais sont nombreux (matériel sale, tube à essai non lavé avant son premier usage, mauvaise manipulation...) et peuvent engendrer une baisse de la mobilité. Les différents biais seront tout de même réduits si l'évaluation est toujours effectuée par la même personne expérimentée (Eilts, 2005 ; Marc, 2015).

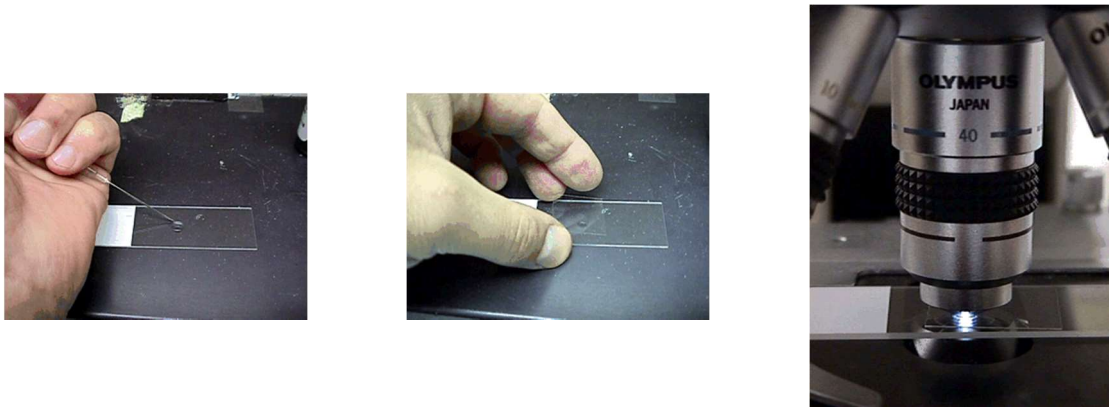


Figure 6 : Examen de la mobilité individuelle du sperme.

7.2. Morphologie des spermatozoïdes

L'examen morphologique des spermatozoïdes, consiste en l'observation au microscope optique d'un frottis de semence coloré le plus souvent à l'éosine-nigrosine, au Giemsa, à la MGG, à l'encre de Chine ou au rose Bengale.

7.2.1. Coloration au Giemsa :

- Déposer 3 à 5 gouttes de colorant Giemsa sur la lame sèche et fixée et 5 à 6 gouttes d'eau distillée neutre pour neutraliser le colorant acide.
- Laisser le colorant agir 15 à 20 minutes puis rincer à l'eau du robinet.

- Laisser sécher les frottis à l'air libre avant la lecture sous microscope.

7.2.2. Coloration au May Grunwald Giemsa:

- Fixer et sécher la lame.
- Recouvrir la lame totalement en versant 15 gouttes de colorant May Grunwald.
- Laisser agir 2 minutes.
- Rincer avec de l'eau du robinet.
- Recouvrir la lame par le colorant Giemsa dilué (30 gouttes de Giemsa dans 20 ml d'eau).
- Laisser agir 20 minutes.
- Rincer à l'eau du robinet.
- Laisser sécher puis observer les lames sous microscope.

7.2.3. Coloration à l'éosine-nigrosine :

7.2.3.1. 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 jusque dissolution.
- Ajuster le pH à 6.8-7 si nécessaire.
- Laisser reposer quelques jours, filtrer et maintenir au réfrigérateur.

7.2.3.2. 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 induite par le colorant.

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

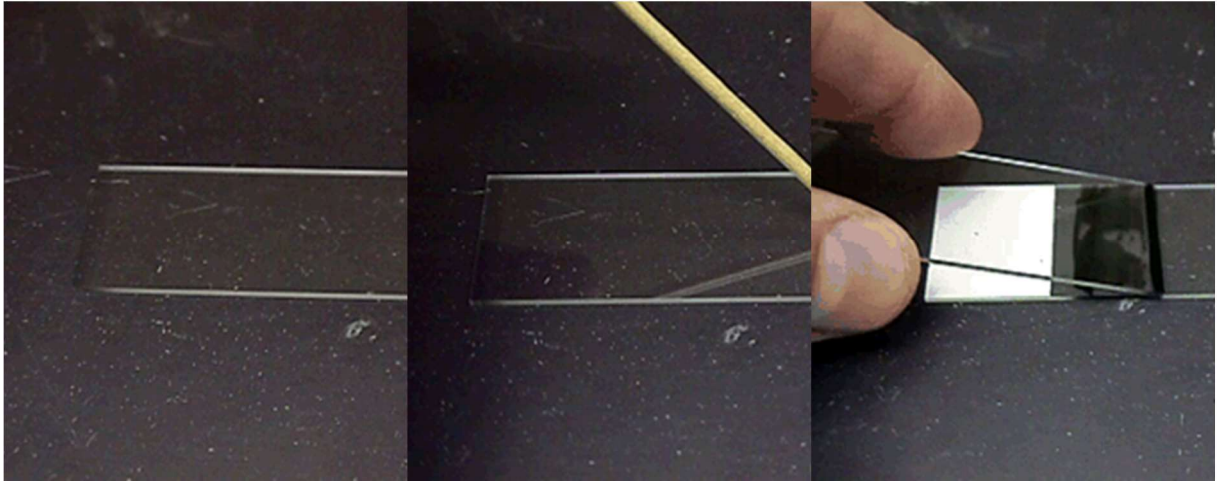


Figure 7 : Technique de réalisation du frottis de semence coloré à l'éosine-nigrosine.

7.2.4. Observation au microscope :

Sous microscope à contraste de phase ou sous immersion (grossissement x 400 à 600), les anomalies sont comptées sur au moins 200 spermatozoïdes. Un sperme normal comporte 10 à 20 % de spermatozoïdes anormaux, présentant des anomalies des différentes parties principalement de la tête.



Figure 8 : Observation des spermatozoïdes au fort grossissement.

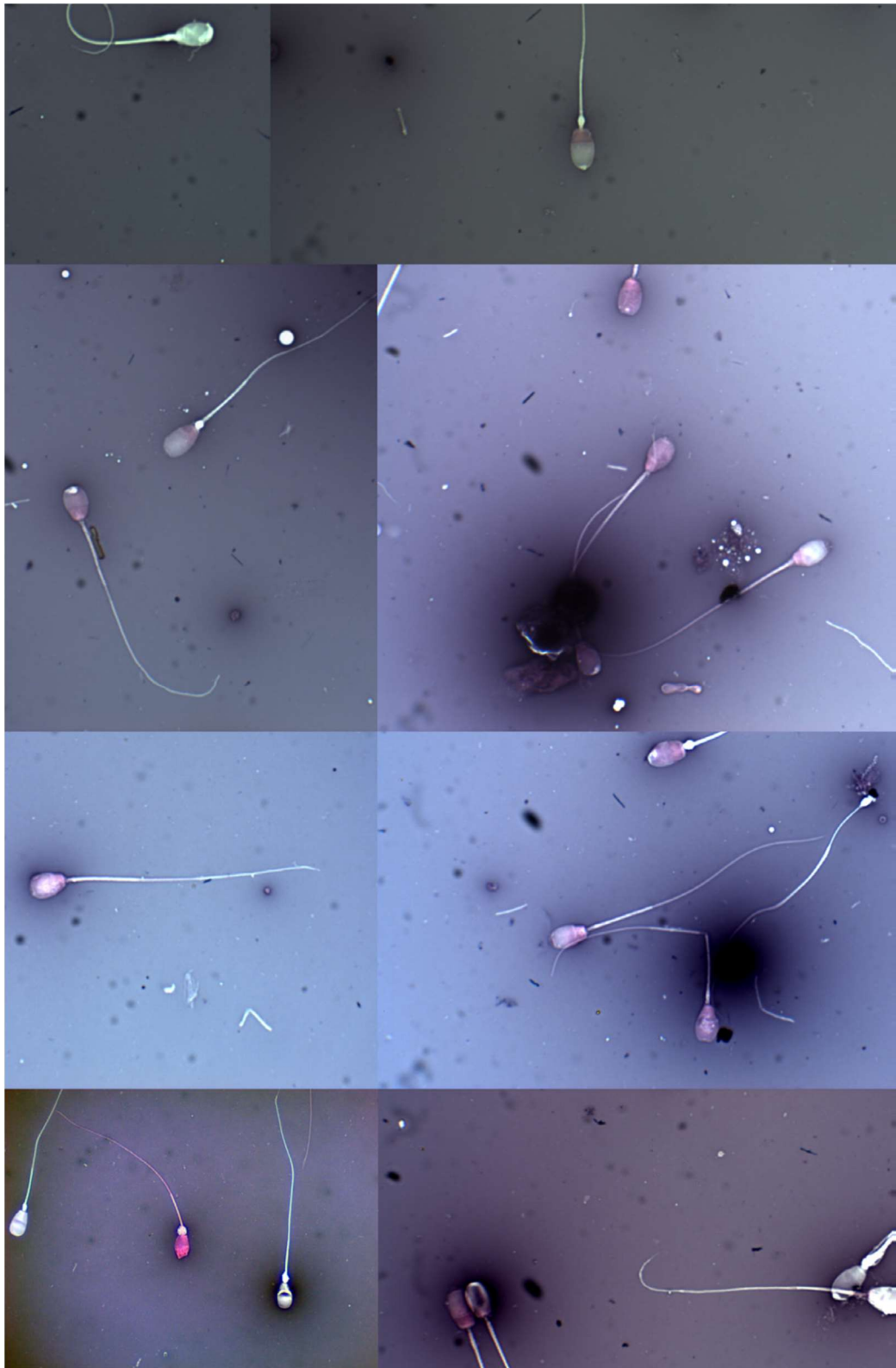


Figure 9 : Anomalies morphologiques de la tête du spermatozoïde (coloration à l'éosine-nigrosine) (Tibary et al., 2018).



Figure 10 : Anomalies morphologiques de la pièce intermédiaire et de la queue du spermatozoïde (coloration à l'éosine-nigrosine) (Tibary et al., 2018).



Figure 11 : Spermatozoïdes d'un bélier infertile avec une incidence élevée de double pièce intermédiaire et queue et gaine mitochondriale anormale (Tibary et al., 2018).

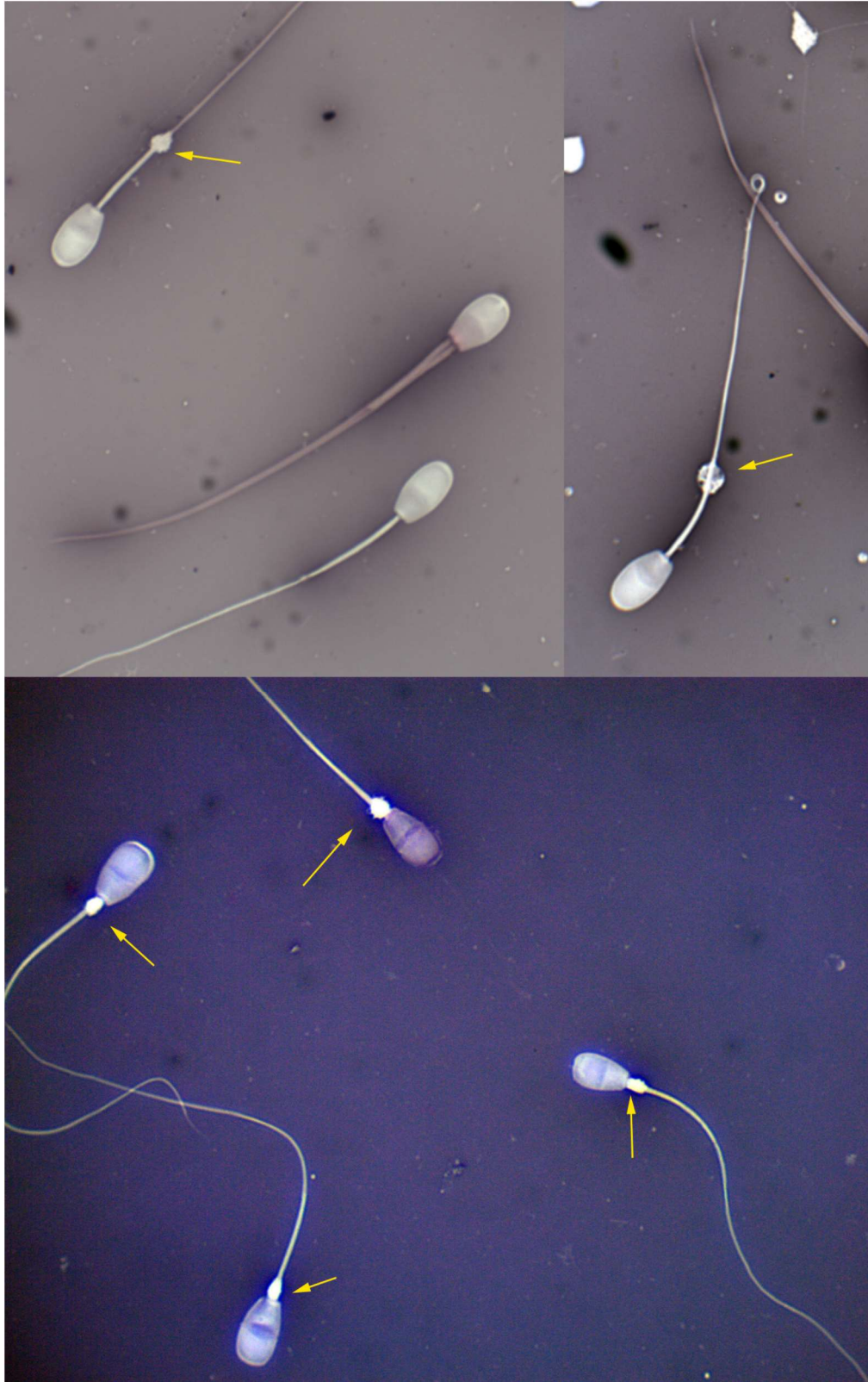


Figure 12 : Gouttelettes protoplasmiques : proximale (en bas) et distale (en haut) (Tibary et al., 2018).

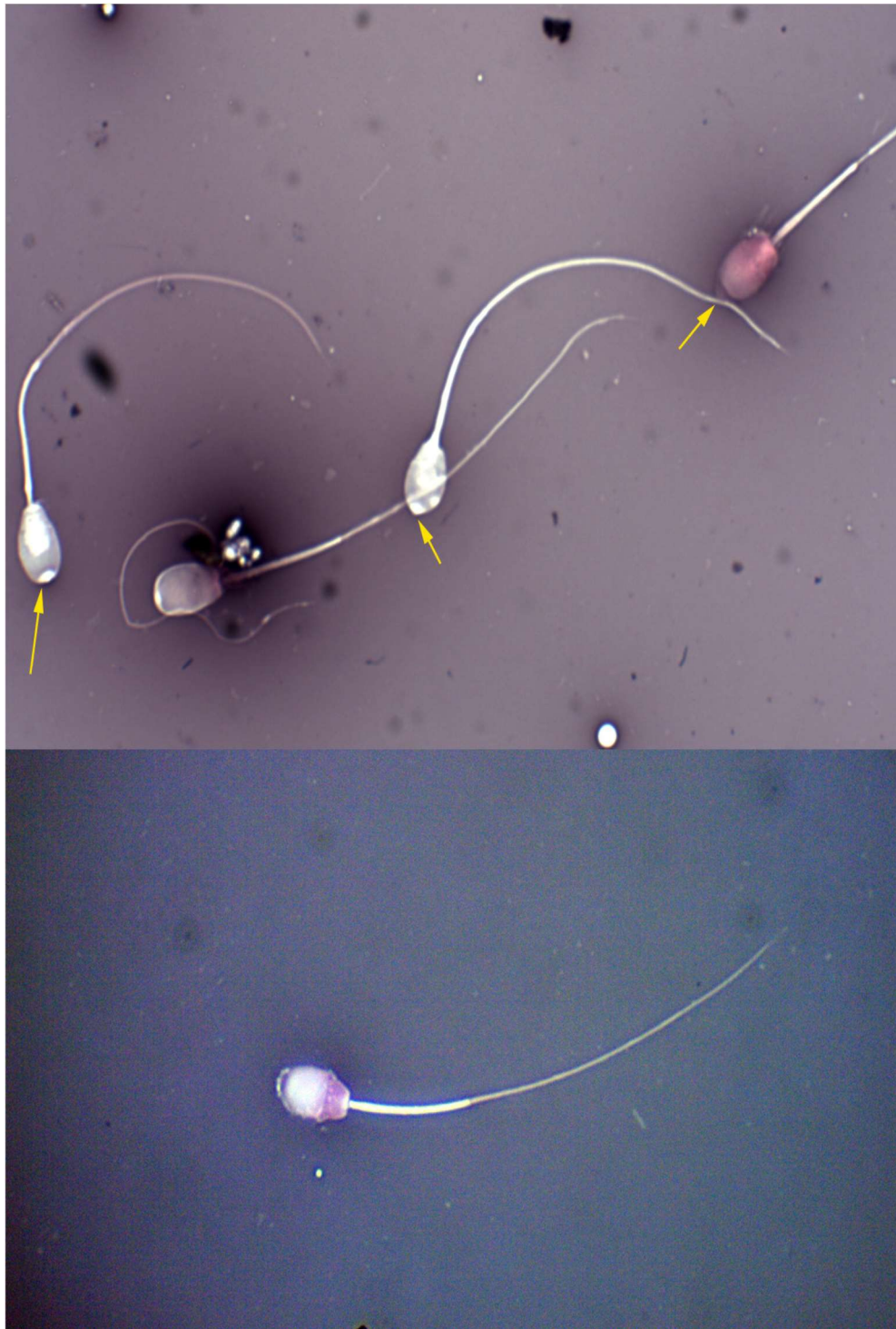


Figure 13 : Acrosomes anormaux : acrosome en bouton (en haut), acrosome détaché / enflé (en bas) (Tibary et al., 2018).

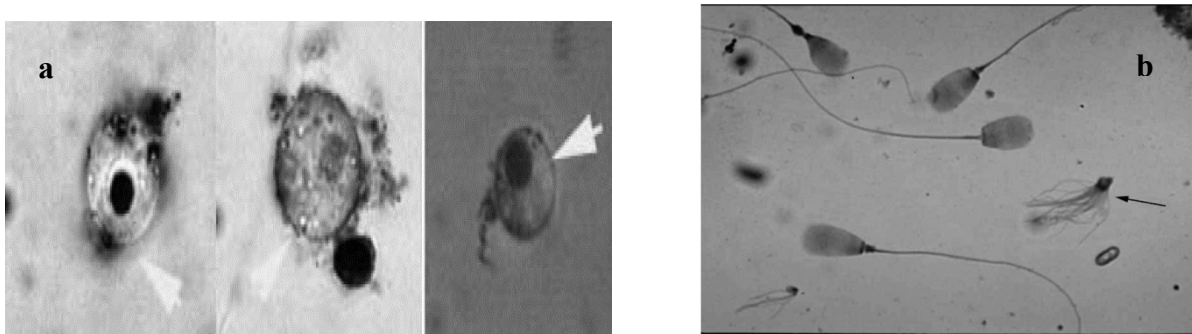


Figure 14 : Spermatozoïdes sphéroïdes ou ronds (a) et cellules en méduses (b) ou bordure ciliée de l'épithélium épидидymaire. Leur présence dans l'éjaculat témoigne d'un processus dégénératif sévère (Tibary et al., 2018).

Détermination de la concentration

La détermination de la concentration peut être effectuée par des méthodes manuelles ou par des méthodes automatisées réservées aux centres spécialisés (utilisation d'un système CASA). Cette analyse n'a pas de valeur prédictive quant à la qualité de la semence sauf si l'animal présente une azoospermie c'est-à-dire une absence totale de spermatozoïdes. La taille de l'animal doit être prise en compte lors de cet examen car le nombre de spermatozoïdes dans l'éjaculat est proportionnel au poids des testicules lui-même corrélé à la taille de l'animal.

Une numération à l'hématimètre Thoma est une méthode simple et précise. Cependant, des cellules de Malassez, de Neubauer conviennent aussi bien, il suffit d'adapter les dilutions et le calcul au volume de la cellule employée.

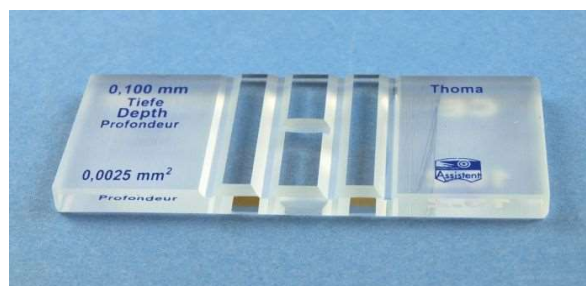


Figure 15 : Hématimètre de Thoma.

Mode opératoire :

- Si le sperme est très peu concentré (translucide), une dilution au $1/10^{\text{ième}}$ ou $1/20^{\text{ième}}$ sera effectuée. Par contre si le sperme est concentré (aspect laiteux) une dilution au $1/100^{\text{ième}}$ ou $1/200^{\text{ième}}$ sera préférable. La dilution se fait avec une solution de chlorure de sodium

hypertonique à 3%, cette solution hypertonique engendre la mort des spermatozoïdes sans provoquer leur lyse. Ainsi, les spermatozoïdes sont immobiles et le comptage est facilité.

- Après homogénéisation du mélange, la solution est déposée à l'aide d'une micropipette afin de remplir par capillarité, sans bulle d'air, la chambre de l'hématimètre. La goutte ne doit pas déborder dans les rigoles de l'hématimètre et elle doit recouvrir complètement et d'un seul coup toute la surface quadrillée de l'hématimètre.

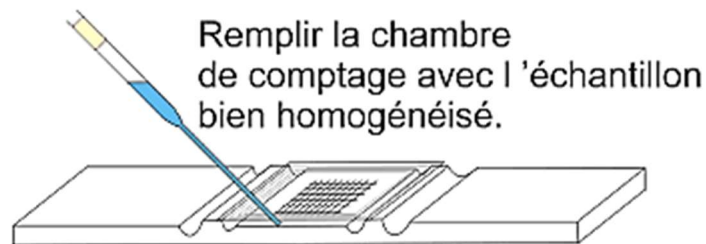


Figure 16 : Dépôt d'une goutte de sperme dans les rigoles de l'hématimètre.

- Coller la lamelle sur l'hématimètre, en humectant les deux bords de celui-ci avec un petit chiffon légèrement humide. Puis faire glisser la lamelle sur la largeur de l'hématimètre et vérifier la bonne adhésion.

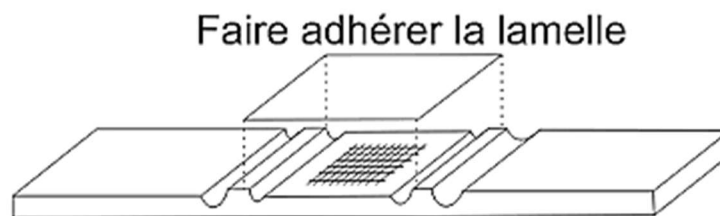


Figure 17 : Collage de lamelle sur l'hématimètre.

- Vérifier la propreté de la cellule sous le microscope.
- Laisser reposer l'hématimètre à plat, en "chambre" humide (une boîte de Pétri avec un chiffon humide) pendant 10 minutes avant de procéder au comptage des spermatozoïdes.
- Ne jamais compter les éléments dans une chambre de comptage desséchée.
- Avant le comptage, il faut bien vérifier à faible grossissement, que la répartition des éléments soit homogène, au moindre doute, le mélange sera homogénéisé de nouveau et le montage recommencé.
- Compter dans le quadrillage, selon une procédure bien établie, les têtes de spermatozoïdes.

- Après repérage des limites de la cellule (grossissement x100), les éléments sont comptés au microscope au grossissement x400. La lame est balayée de façon méthodique, de gauche à droite et du haut vers le bas.
- En général les spermatozoïdes sont comptés sur 5 grands carrés. Afin d'éviter de surévaluer le nombre de spermatozoïdes, pour les éléments situés entre deux carrés, ne sont comptés que ceux qui sont à cheval sur les graduations, en général celles formant la lettre L. Le calcul du nombre de spermatozoïdes est présenté dans la formule ci-dessous :

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

Quadrillage de la cellule de Thoma

Dans la cellule de Thoma, le grand carré central : 1 mm² est formée de 16 grands carrés composés chacun de 16 petits carrés. 1 grand carré : dimension 0.2 mm x 0.2 mm, Profondeur : 0.1 mm.

Surface : $0.2 \times 0.2 \times 0.1 = 0.004 \text{ mm}^3 = 4 \times 10^{-3} = 4 \times 10^{-6} \text{ cm}^3 = 4 \times 10^{-6} \text{ ml}$.

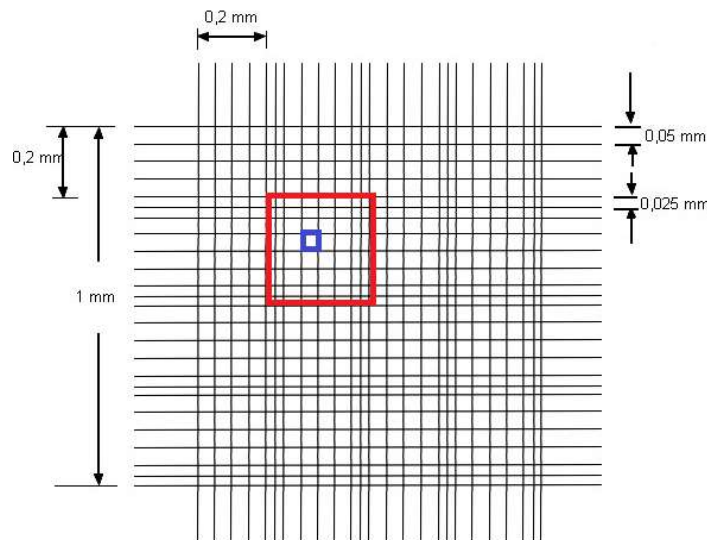


Figure 18 : Quadrillage de la cellule de Thoma.

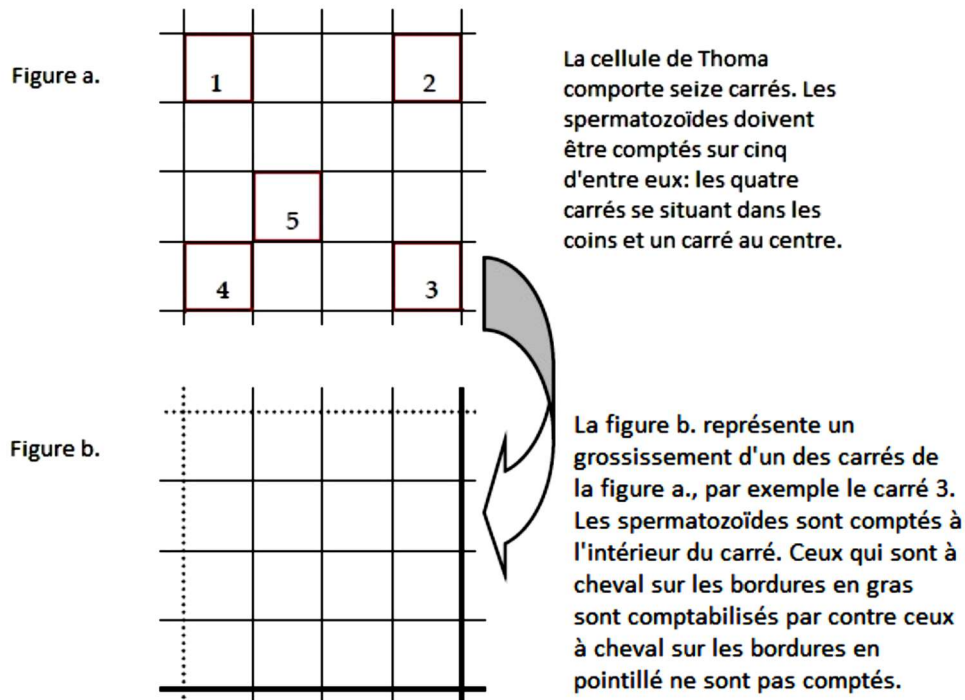


Figure 19 : Méthode de comptage des spermatozoïdes à l'aide de l'hématimètre de Thoma.

Entretien d'un hématimètre :

- Rincer la cellule et la lamelle à l'eau courante puis à l'alcool à 70 %.
- Sécher la cellule et la lamelle avec un torchon sec, doux et non pelucheux (éviter de la rayer)

Principales sources d'erreurs :

- Cellule à numération non nettoyée et/ou non dégraissée.
- Empreinte de doigt sur la lamelle.
- Mauvaise homogénéisation.
- Erreur de pipetage.
- Temps non respectés.
- Comptage dans une chambre de comptage desséchée.
- Présence de bulles d'air dans la cellule.
- Absorption du liquide en cas de débordement.
- Mauvais réglage du microscope.
- Erreurs de dilutions.
- Erreurs de calculs / erreurs d'unités.