

gestes et techniques

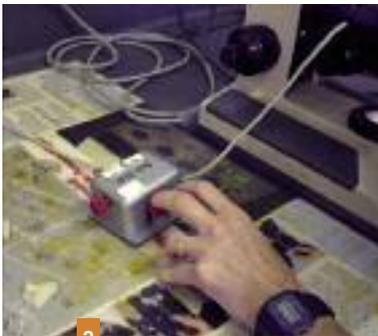
comment réaliser un spermogramme

Isabelle Barrier-Battut

Les Haras nationaux
Centre de formation et expertise
en élevage équin
La Jumenterie du Pin
61310 Exmes

Objectif pédagogique

■ Savoir réaliser et interpréter un spermogramme chez l'étalon.



2 Un compteur manuel à double entrée.

NOTE

* cf. Gestes et techniques "Le prélèvement de sperme chez l'étalon", du même auteur, dans ce numéro.

Essentiel

■ Un spermogramme permet de situer les étalons, au moment de l'examen, parmi trois catégories : insémination artificielle immédiate, monte en main, ou insuffisant.

■ Le classement de l'étalon est assorti d'une taille de harem maximale, en fonction du nombre moyen de spermatozoïdes produits.

chez l'étalon

Un spermogramme permet d'évaluer les qualités de reproducteur d'un étalon à l'aide d'examen de sa semence. Pour une interprétation correcte, la procédure doit être standardisée, avec vidange des réserves séminales, puis mesures sur quatre éjaculats successifs (un par jour).

Le spermogramme consiste en une série d'examens de l'étalon et de sa semence, qui permettent d'évaluer son aptitude à la reproduction, d'expliquer une infertilité avérée, ou de suivre la convalescence d'une affection ayant atteint la spermatogénèse.

● Les examens doivent être réalisés dans des conditions standardisées, pour pouvoir être interprétés. En France, la procédure de spermogramme des Haras nationaux a été mise au point en collaboration avec l'INRA de Nouzilly, dans les années 1980-1990, à la suite d'études statistiques sur la répétabilité des caractéristiques séminales et leurs relations avec la fertilité.

● Cette procédure permet donc une interprétation étayée par des bases scientifiques solides. Sont mesurés : le volume de semence, la concentration en spermatozoïdes, la mobilité après dilution, la mobilité après conservation à 4°C pendant 24 h et 48 h, le pourcentage de spermatozoïdes vivants, le pourcentage des différentes formes anormales.

LES CONDITIONS D'EXAMEN

● Le spermogramme est réalisé sur 5 jours consécutifs, avec une collecte de semence quotidienne.

● Une "vidange" des réserves séminales du tractus génital est réalisée le 1^{er} jour ; des mesures sont ensuite effectuées les 4 jours suivants.

LES MESURES À EFFECTUER

Des paramètres comportementaux

Plusieurs paramètres permettent d'évaluer la libido de l'étalon et sa facilité à la collecte



1 Le matériel d'analyse pour réaliser un spermogramme (photos la Jumenterie du Pin).

matériel

- Pour la collecte de semence :
 - un local adapté, une jument en chaleur ou un mannequin, un vagin artificiel adapté à l'étalon*.
- Pour les analyses (photo 1) :
 - un réfrigérateur ;
 - une étuve thermostatée à 36°C ;
 - un bain-marie thermostaté à 36°C, avec portoirs pour tubes de 5 ml ;
 - un microscope équipé d'une platine chauffante, avec oculaires x 10 et objectifs x 10, x 20 et x 40 ;
 - une cellule hématimétrique (cellule de Thoma, par exemple) ;
 - des micropipettes permettant de mesurer 10 µl, 100 µl, et des volumes compris entre 0,1 et 1 ml, avec les cônes correspondants ;
 - un chronomètre ;
 - un biberon gradué, un entonnoir, des gazes stériles, une éprouvette graduée 50 ml.
- Ce matériel est indispensable et peut suffire pour la réalisation occasionnelle d'un spermogramme.
- Pour une utilisation plus fréquente, il est fortement conseillé de disposer en outre, d'un colorimètre ou d'un spectrophotomètre et de cuves appropriées, d'une platine chauffante distincte de celle du microscope, d'un compteur manuel à double entrée (photo 2).

de semence :

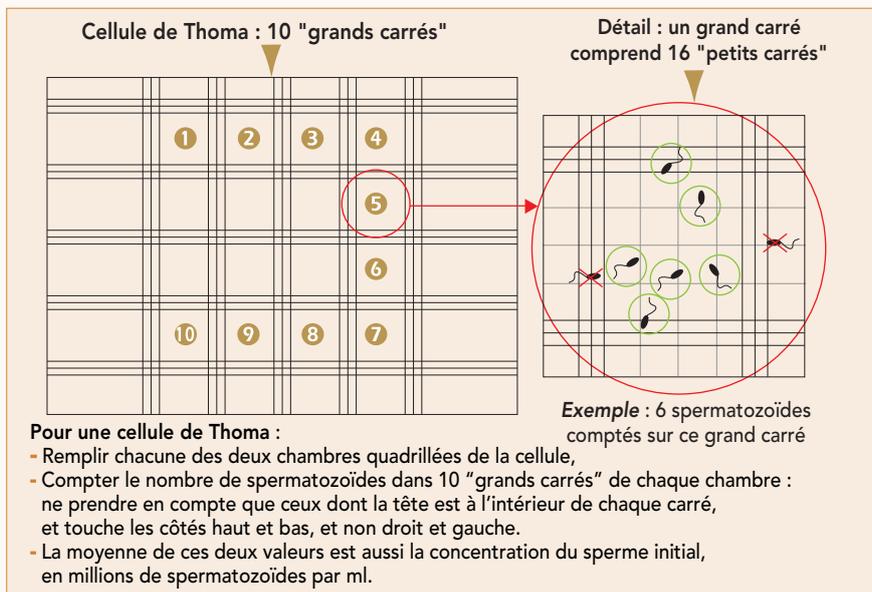
- le temps de préparation : le chronomètre est déclenché lorsque l'étalon entre dans le local de collecte, puis est arrêté lorsque l'animal est en érection. Ce temps varie selon

Encadré - Les analyses de laboratoire effectuées sur le sperme

La concentration en spermatozoïdes

- La concentration en spermatozoïdes est estimée à l'aide d'un photomètre ou colorimètre correctement étalonné (photo 3). Cette estimation permet de diluer rapidement le sperme à $20 \cdot 10^6$ spermatozoïdes/ml.
- Une mesure précise avec une cellule hématimétrique (cellule de Thoma ou de Malassez) complète cette estimation : dilution de 100 ml de sperme pur avec 3,9 ml de solution de formaldéhyde (il s'agit d'un produit toxique par contact et par inhalation : porter idéalement un masque et des gants) (figures 1, 2).
- **Attention** : la platine chauffante doit être éteinte, sinon le liquide s'évapore, et la concentration en spermatozoïdes est surestimée. Ce comptage doit donc être effectué lorsque toutes les observations nécessitant une platine chauffante (mobilité, éosine) ont été faites.

Figure 1 - Mesure de la concentration en spermatozoïdes par une cellule de Thoma



La dilution

- La concentration doit être de $20 \cdot 10^6$ spermatozoïdes par ml, et le volume final de sperme dilué doit être de 3 ml par tube de 5 ml pour être en conditions d'aérobies.
- Pour chaque tube contenant 3 ml de lait, ajouter un volume $V=60/(C-20)$ ml de sperme pur (C étant la concentration en spermatozoïdes du sperme pur en millions/ml). Homogénéiser en agitant le tube bouché, puis pipetter le même volume V du mélange, et le jeter (photo 4).

L'estimation de la mobilité

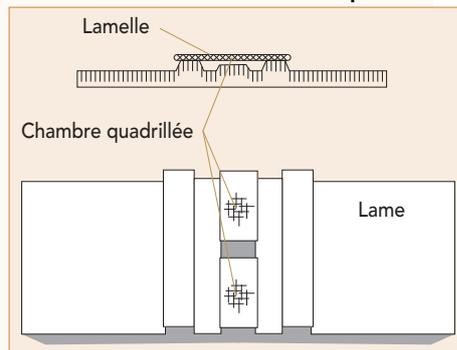
- Pour chaque tube de sperme dilué, déposer une goutte de 10 µl entre lame et lamelle, et observer au microscope à pla-

tine chauffante, grossissement x 200, pour estimer le pourcentage de spermatozoïdes mobiles, et le mouvement majoritaire : "fléchant" (rectiligne rapide), saccadé, lent, circulaire, sur place.

Attention : toujours observer plusieurs champs sur chaque goutte, afin d'avoir une idée d'ensemble (photos 5, 6).

- Les deux tubes sont ensuite placés au réfrigérateur.
- Le 1^{er} sert à estimer la mobilité, après 24 h de conservation à 4°C : sortir le tube du réfrigérateur, homogénéiser, laisser réchauffer au bain-marie pendant 10 min, puis déposer deux gouttes entre lame et lamelle et noter la mobilité.

Figure 2 - Procédure d'estimation de la mobilité des spermatozoïdes sur cellule hématimétrique



Suite page suivante



3 Un spectrophotomètre.



4 Dilution : 2 tubes contenant 3 ml de lait écrémé avec antibiotiques sont préparés avant la récolte de sperme et conservés au bain marie. Le volume de sperme pur, calculé pour avoir 20 millions de spz par ml, est ensuite ajouté.



5 Notation de la mobilité : 2 gouttes de sperme dilué sont déposées entre lame et lamelle sur la platine chauffante, avant d'être examinées au microscope.

que l'étalon est habitué ou non à la collecte. Pour un "débutant", le temps de préparation peut être long les premiers jours, mais doit diminuer rapidement ;

- le temps de collecte : il correspond au temps total entre le moment où l'étalon

entre dans le local de collecte, et le moment où l'éjaculat est obtenu ;

- le nombre de sauts sur le mannequin ou la jument, avec intromission dans le vagin artificiel. Il doit être compris entre un et deux.

RUBRIQUE

Encadré - Les analyses de laboratoire effectuées sur le sperme (suite)

- Le 2nd tube est sorti du réfrigérateur après 48 h de conservation, et la mobilité est notée de la même façon.

Coloration éosine-nigrosine

● La coloration éosine-nigrosine permet d'évaluer le pourcentage de spermatozoïdes vivants (photos 7, 8, 9, 10) :

- sur la platine chauffante, déposer une goutte de sperme pur sur un côté de la lame, puis une goutte de colorant à côté ;
- mélanger 10 s à l'aide d'un cône de micropipette et laisser agir 50 s ;
- étaler le frottis avec une lamelle, puis compter au microscope à platine chauffante, grossissement x 400.
- Les spermatozoïdes morts sont colorés en rouge, ceux qui étaient vivants lors de l'étalement du frottis restent blancs ou apparaissent en vert clair.

Compter le pourcentage de spermatozoïdes vivants sur au moins 150 spermatozoïdes.

Attention : la lame doit impérativement rester sur la platine chauffante pendant ces opérations, sinon le frottis se réhydrate, et le nombre de spermatozoïdes morts est surestimé.

Le dénombrement des formes anormales de spermatozoïdes

● Pour dénombrer les formes anormales de spermatozoïdes, préparer une suspension de spermatozoïdes à 20 millions/ml dans du formaldéhyde (3 ml de formaldéhyde dans un tube, ajouter le même volume de sperme pur que dans les tubes de lait pour mobilité), puis compter au moins 150 spermatozoïdes entre lame et lamelle, au grossissement x 400 avec

contraste de phase, platine chauffante éteinte (photo 11).

● Calculer ensuite les pourcentages : spermatozoïdes normaux, têtes seules, têtes anormales, anomalies du flagelle dans son ensemble, anomalies de pièce intermédiaire, anomalies de la pièce principale.

La mesure du volume de sperme

- Pour calculer le volume de spermatozoïdes par éjaculat, verser le sperme restant dans une éprouvette graduée, noter le volume, et ajouter le volume utilisé pour les analyses : photomètre, tubes de survie, tube pour formes anormales.
- Le produit de ce volume par la concentration en spermatozoïdes permet de calculer le nombre total de spermatozoïdes par éjaculat, donc de prévoir le nombre de juments inséminables.



6 Spermatozoïdes fléchants (trajectoires vertes) et spermatozoïdes immobiles (points rouges).



7 Coloration éosine-nigrosine. - Dépôt d'une goutte de sperme pur sur un côté de la lame.



8 Dépôt d'une goutte de même volume d'éosine-nigrosine : - Mélanger pendant 10 s à l'aide d'un cône de micropipette ; - Laisser agir 50 s ; - Étaler le frottis avec une lamelle.



9 Frottis prêt à la lecture sous microscope. Attention, il doit impérativement rester sur une platine chauffante jusqu'à la fin de la lecture.



10 La filtration du sperme sur gaze stérile dans un biberon gradué (photos la Jumenterie du Pin).

Les analyses de laboratoire

- Le sperme est filtré sur gaze stérile, dans un biberon gradué (photo 10).
- Plusieurs analyses sont ensuite réalisées : la concentration en spermatozoïdes, la dilution, l'estimation de la mobilité, la coloration éosine-nigrosine, le dénombrement des formes anormales de spermatozoïdes, la mesure du volume de sperme (encadré).

Les bases de l'interprétation

- La procédure INRA/Haras nationaux permet de classer les étalons, au moment de l'examen, en trois catégories :
 1. satisfaisant pour une utilisation en insémination artificielle immédiate ou en semence réfrigérée (I.A.R.) ;
 2. utilisation en monte en main ou insémination artificielle immédiate, mais pas en

RUBRIQUE



11 Frottis de spermatozoïdes. Coloration éosine-nigrosine (photos la Jumenterie du Pin).

consommables

- des tubes plastiques de 5 ml ;
- des lames et lamelles pour microscopie ;
- du lait écrémé additionné d'antibiotiques amoxicilline 0,1 g/l (Clamoxyl®** 1 g), gentamicine 50 mg/l (Gentalline®** 80 mg ou Gentalline®** 160 mg) ;
- une solution de formaldéhyde : pour 1 l de solution, diluer 50 ml de formaldéhyde à 37 p. cent (P/V) dans du NaCl à 9 p. mille ;
- une solution d'éosine-nigrosine : 1 p. cent d'éosine Y et 2 p. cent de nigrosine, en solution dans du citrate de sodium, pH 6,8.
- **Tout le matériel en contact avec la semence doit être à 36°C** : le mettre à l'avance au chaud dans l'étuve (biberon, entonnoir, filtre), au bain-marie (tubes contenant 3 ml de lait écrémé, tube contenant environ 0,1 ml d'éosine-nigrosine) ou sur la platine chauffante (lames, lamelles, cônes pour micropipettes).

semence réfrigérée (M.M.) ;

3. caractéristiques séminales insuffisantes pour une utilisation normale comme reproducteur ("insuffisant"). Pour cela, la moyenne des résultats obtenus est comparée à des seuils (tableau).

Exemple :

- Pour qu'un étalon entre dans la catégorie I.A.R. ou M.M., les conditions doivent être remplies pour tous les paramètres mesurés.
- Si au moins un résultat d'examen est insuffisant, l'étalon est classé dans la catégorie "insuffisant".

DISCUSSION

- Le spermogramme est un examen ponctuel de la qualité de semence : il ne préjuge donc pas de l'évolution dans le temps de cette qualité.
- Le spermogramme ne permet pas une prédiction certaine de la fertilité. Par exemple, quelques étalons classés I.A.R. peuvent tout de même s'avérer infertiles ; cependant, les étalons classés "insuffisants" sont

Tableau 1 - Les valeurs seuils pour la classification des étalons d'après spermogramme

| Résultats | Insémination artificielle réfrigérée | Monte en main ou I.A immédiate |
|---|--------------------------------------|--------------------------------|
| ► Pour les races de sang | | |
| ● Concentration | ≥ 120 x 10 ⁶ spz/ml | ≥ 73 x 10 ⁶ spz/ml |
| ● Nombre total de spz par éjaculat | ≥ 2,5 x 10 ⁹ | ≥ 2,5 x 10 ⁹ |
| ● Mobilité immédiatement après dilution (spz mobiles) | ≥ 70 p. cent | 55 ≤ 70 p. cent |
| ● Mobilité après 24 h (spz mobiles) | ≥ 40 p. cent | 15 ≤ 40 p. cent |
| ● Mobilité après 48 h (spz mobiles) | ≥ 30 p. cent | 5 ≤ 30 p. cent |
| ● Pourcentage total de spz anormaux | ≤ 36 p. cent | ≤ 36 p. cent |
| ● Détail des anomalies : | | |
| - Têtes seules | ≤ 3 p. cent | ≤ 3 p. cent |
| - Têtes anormales | ≤ 5 p. cent | ≤ 5 p. cent |
| - Pièces intermédiaires anormales | ≤ 43 p. cent | ≤ 43 p. cent |
| - Flagelles anormaux | ≤ 4 p. cent | ≤ 4 p. cent |
| ► Pour les étalons de trait | | |
| ● Concentration | ≥ 120 x 10 ⁶ spz/ml | ≥ 28 x 10 ⁶ spz/ml |
| ● Nombre total de spz par éjaculat | ≥ 1,9 x 10 ⁹ | ≥ 1,9 x 10 ⁹ |
| ● Mobilité immédiatement après dilution (spz mobiles) | ≥ 60 p. cent | ≥ 31 p. cent |
| ● Mobilité après 24h (spz mobiles) | ≥ 30 p. cent | ≥ 3 p. cent |
| ● Mobilité après 48h (spz mobiles) | ≥ 20 p. cent | ≥ 0 p. cent |
| ● Pourcentage total de spz anormaux | ≤ 50 p. cent | ≤ 50 p. cent |
| ● Détail des anomalies : | | |
| - Têtes seules | ≤ 3 p. cent | ≤ 3 p. cent |
| - Têtes anormales | ≤ 5 p. cent | ≤ 5 p. cent |
| - Pièces intermédiaires anormales | ≤ 33 p. cent | ≤ 33 p. cent |
| - Flagelles anormaux | ≤ 4 p. cent | ≤ 4 p. cent |

considérés comme à haut risque d'infertilité dans des conditions normales de gestion.

- **Le classement de l'étalon est assorti d'une taille de harem maximale en fonction du nombre moyen de spermatozoïdes produits.** En insémination artificielle de semence fraîche, une dose doit contenir un minimum de 200.10⁶ spermatozoïdes, et le nombre maximal de doses à produire par jour est estimé à environ 13 p. cent du harem.

Exemple :

le détail de calcul est le suivant :

- 2.10⁹ spermatozoïdes par éjaculat :
- un maximum de 10 doses par jour,
 - un harem maximum de 76 juments.

CONCLUSION

- Le spermogramme est assez facile à réaliser.
- Mais il demande du matériel, une grande rigueur et de l'habitude pour certains examens, comme la notation précise de la mobilité. □

NOTE

* Spécialités de médecine humaine

Pour en savoir plus

- Collectif, "Insémination artificielle équine, Guide pratique", éd. les Haras nationaux, 3^e éd., 2004;321 p.

RUBRIQUE