

TP n°01 : Etude du sperme épидидymaire

Objectif : Collecte du sperme épидидymaire du bélier pour l'étudier macro et microscopiquement à l'état frais, après dilution et conservation.

Rappel anatomo- physiologique :

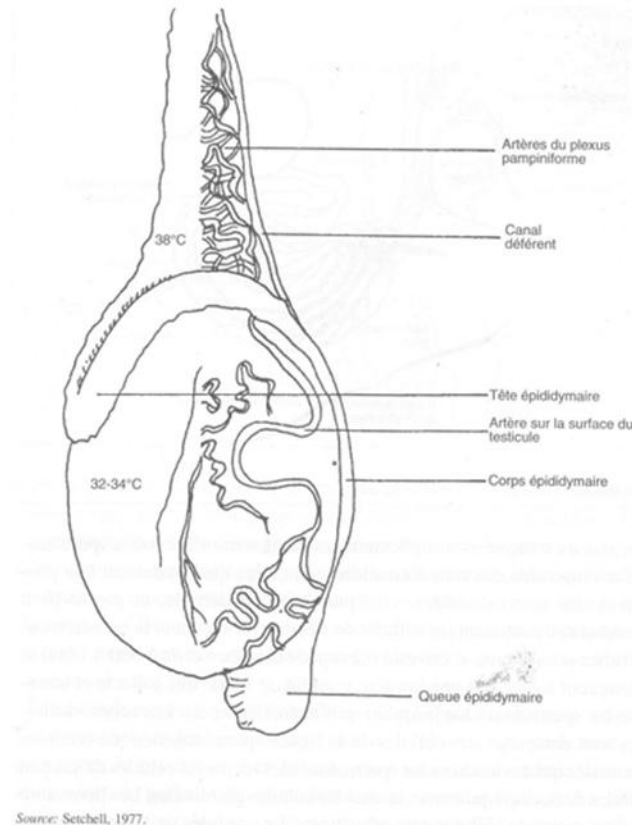


Figure 01 : Vascularisation du testicule et températures enregistrées à l'intérieur de celui-ci

Chez tous les mammifères, le pouvoir fécondant des spermatozoïdes apparaît dans l'épididyme, organe formé d'un long tube reliant le testicule à l'urètre.

Les spermatozoïdes testiculaires ne sont ni motiles, ni féconds. Ils acquièrent leur fertilité et leur mobilité progressive pendant le transit épидидymaire, qui dure environ une quinzaine de jours. Les spermatozoïdes fertiles et motiles restent près d'une semaine stockés dans la région caudale de cet organe qui sert de réservoir.

Des multiples observations ont mis en évidence que le milieu épидидymaire est un excellent milieu de conservation. Sa composition est complexe et résulte de l'activité de réabsorption et de sécrétions de l'épithélium de cet organe. De nombreuses protéines présentes dans ce milieu sont probablement liées à la protection des gamètes notamment contre les peroxydations.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

1. Obtention de spermatozoïdes épидидymaires

Pour l'ensemble du travail présenté, les spermatozoïdes (spz) épидидymaires d'ovins sont recueillis sur des organes prélevés après abattage de l'animal.

Le contenu du tubule de la région caudale est perfusé à l'aide d'huile de paraffine à partir d'une aiguille insérée dans la lumière du canal déférent de la partie caudale de l'épididyme (figure 1).

Les volumes de liquide obtenus varient de 0,8 à 2,5 ml avec une concentration moyenne des gamètes de 8×10^9 spz.ml⁻¹ pour les béliers selon Guérin et al. (2003).



Figure 02: Perfusion de la partie caudale de l'épididyme de bélier. Le contenu de la lumière du tubule épидидymaire est recueilli en perfusant de l'huile à partir du vas 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 région caudale.

2. Conservation des gamètes

Les spermatozoïdes épидидymaires peuvent être obtenus soit immédiatement après le prélèvement de l'épididyme soit après conservation de celui-ci pendant plusieurs jours à 4 °C.

Description des dilueurs utilisés pour la conservation de la semence à 4° C

Les dilueurs qui peuvent être utilisés sont :

- i. Solution saline seule (S) ;
- ii. Solution saline plus 10 % de jaune d'œuf (SJO) ;
- iii. Solution saline plus 10 % de blanc d'œuf (SBO) ;
- iv. Solution saline plus 10 % de jaune d'œuf plus 10 % de blanc d'œuf (SJBO).

Prédilution

Immédiatement après l'examen, mélanger le sperme avec un dilueur au bain-marie et en quantité équivalente au volume initial de la collecte. Le but de cette prédilution est de prolonger la vie des spermatozoïdes en attendant qu'on détermine la concentration et le taux de dilution finale pour le sperme.

Après la dilution, les échantillons étaient placés dans des gobelets contenant de l'eau à 37° C puis refroidis à 4° C (semence conservée durant 24 heures). Pour le refroidissement de la semence, les échantillons de la semence conservée placés dans des gobelets contenant eau à 37° C ont été gardés en chambre froide à 4° C.

3. Examen macroscopique

La couleur

Habituellement jaune blanchâtre, laiteux ou crémeux, on recherchait les anomalies de couleur notamment la coloration rose due à la présence de sang en nature dans le sperme, et la coloration brunâtre due à la présence de sang altéré ou grisâtre qui signe la présence de pus.

Le volume

La mesure du volume de la collecte s'effectue par la lecture à l'aide des micropipettes une fois que la graduation des tubes de collecte utilisés n'est pas plus visible et ne donne pas la mesure exacte du volume.

Aspect et Consistance

Liquide crémeux, épais, légèrement jaunâtre ou grisâtre selon les espèces. Chez le bélier, il est blanc crémeux.

Viscosité : 3.7 (eau distillée :1) : Elle est en rapport étroit avec la concentration en en spz et ions dans le plasma séminal.

pH (pH-mètre, papier indicateur)

- Lecture immédiate : acidification rapide (acide lactique).
- Valeurs normales : 6.5 et 6.8.

4. Examen microscopique

La motilité massale

Pour mesurer la motilité massale, déposer une goutte de sperme pure sur une lame placée sur la platine du microscope sur un grossissement de x 100.

L'observation doit être car la motilité massale du sperme pur à une température ambiante diminue rapidement au bout de 10 à 15 secondes.

Utiliser une échelle de notes subjectives allant de 0 à 5 pour la mesure selon la grille de Smyth et Gordon, (1967).

Note Aspect du mouvement

0 Immobilité totale

1 Mouvement individualisé

2 Mouvement très lent

3 Mobilité massale générale de faible amplitude

4 Mobilité massale rapide, sans tourbillons rapides (avec tourbillons lents),

5 Mobilité massale rapide, avec tourbillons rapides

La motilité individuelle

- Examen après dilution (en moyenne 1/20) et à température adéquate
 - Examen d' 1 goutte entre lame et lamelle(x 200 - 500).
 - Examen de 3 à 5 champs
- Interprétation
 - Très bonne qualité : 80 à 100 % de spz mobiles.
 - Bonne qualité : 60 à 79 %.
 - Qualité correcte: 40 à 59 %.
 - Faible qualité : < 40 %.

Taux de mortalité et anomalies:

A ce niveau, on pratique aussi un frottis. Une aliquote de semence est mise en présence d'un colorant biologique (Eosine-Nigrosine) puis un comptage est effectué afin de déterminer le pourcentage de spermatozoïdes morts et anormaux.

Les spermatozoïdes morts ont leur membrane perméable et prennent une coloration rosée. Les spermatozoïdes vivants ont une membrane imperméable et apparaissent donc incolores.

La même coloration à l'éosine-nigrosine permet de classer les spermatozoïdes selon les catégories suivantes :_normaux ;_anomalies de tête (malposition, tête piriforme ou ronde, allongée ou étroite, microcéphalique ou macrocéphalique, tête double, acrosome anormal) ;

Numération :

Après dilution, l'utilisation d'une cellule de Thoma (figure 03) permet de compter le nombre de spermatozoïdes contenus dans la collecte.

Ce nombre peut, ou non, être compatible avec la fécondation d'une femelle.

Principe de la numération

- Attendre quelques minutes après la dilution.
- Comptage des spz dans 4 grands carrés.
- Prendre en compte seulement les spz présents sur les limites supérieures et Gauches.

Formule : $N \times 4 \times 10 \times 100$

N : nombre de spzs.

4 : si comptage dans 4 grands carrés (= 1/4 de mm²)

10 : chambre de numération : 1/10 mm.

100 si dilution à 1 %.

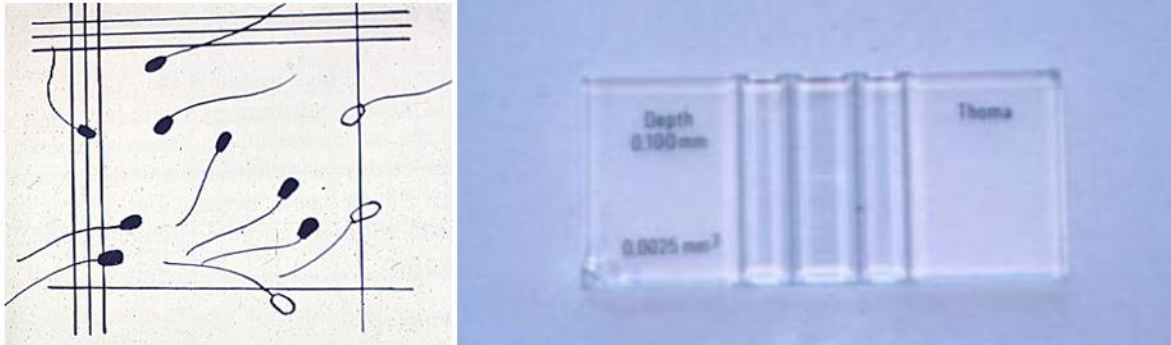


Figure 03 : Numération par cellule de Thoma

TP n°02 : Le frottis vaginal chez les femelles domestiques.

Objectif :

La réalisation du frottis vaginal vise la détermination du stade physiologique de la reproduction chez les femelles domestiques.

Le cycle vaginal est caractérisé par des variations cytologiques cycliques de l'épithélium de revêtement de la muqueuse vaginale. Ce cycle est lié aux variations cycliques endocriniennes. Les changements cytologiques permettent l'identification des différentes phases du cycle sexuel et même le suivi de l'ovulation chez les rongeurs (rate) et la chienne par exemple.

A. Matériels

*Des écouvillons stérilisés

* Lames

*Fixateur : Alcool 70°

*Des colorants:

- Le colorant de Bleu de méthylène
- Le colorant de Giemsa et de May-Grünwald
- Le colorant de Papanicolaou

* Microscope optique

B. Technique de réalisation du frottis vaginal

1. Contention de la femelle.

2. L'écouvillonnage

Le prélèvement doit être rapide, facile, avec un minimum d'inconfort pour la femelle.

On utilise un écouvillon stérile en coton à usage unique. L'écouvillon stérile doit être humidifié avec du sérum physiologique stérile. Cela peut ne pas être nécessaire si la femelle présente des écoulements vaginaux suffisants (pendant le proestrus ou l'œstrus). Néanmoins, lorsqu'on utilise du matériel non humidifié, le coton collecte les cellules mais également du mucus, ce qui peut gêner l'étalement du prélèvement.

Technique d'écouvillonnage chez la chienne :

Les lèvres vulvaires peuvent être écartées manuellement avec le pouce et l'index. L'écouvillon est introduit au niveau de la commissure dorsale de la vulve (figures 01).

Puis il est orienté crânio-dorsalement en direction de la colonne vertébrale. Une fois passée au-dessus de l'arcade ischiatique, l'instrument est dirigé crânialement sur une quinzaine de centimètres. Au contact de la muqueuse du vestibule ou de la partie caudale du vagin, l'écouvillon subit une rotation. Le mouvement doit être imprimé avec une force suffisante pour assurer un bon contact avec la muqueuse vaginale. Puis l'écouvillon est extrait délicatement des voies génitales

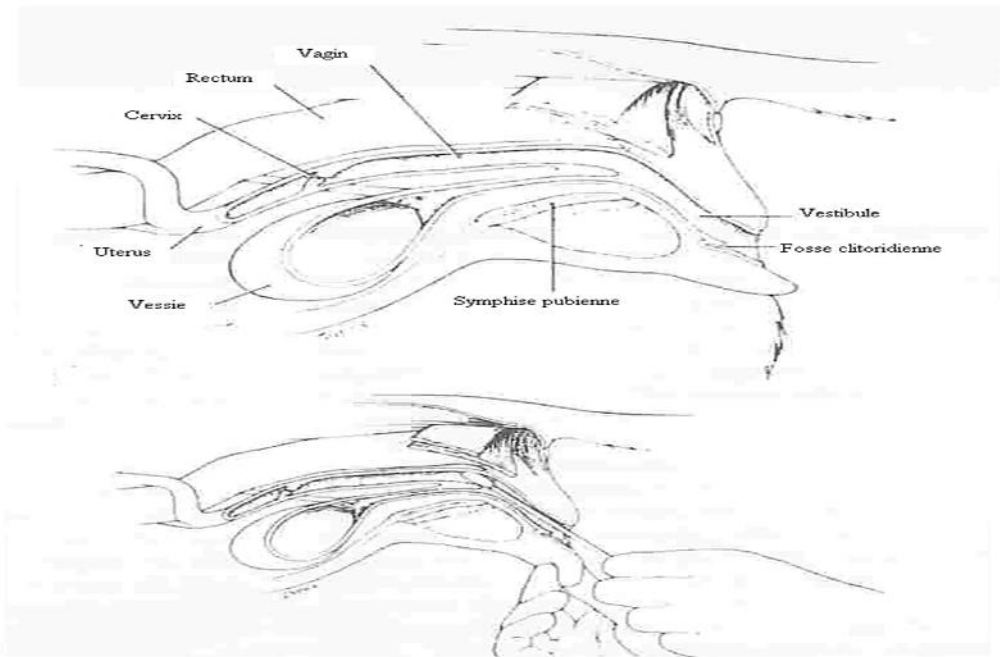


Figure 01 : Rappels anatomiques et technique de prélèvement chez la chienne

3. L'étalement

L'étalement sur une lame de microscope doit être effectué rapidement, afin d'éviter le dessèchement du prélèvement. L'écouvillon est roulé sur une lame propre sans frottement pour ne pas détériorer les cellules.

Généralement deux à trois lignes parallèles, bien séparées, peuvent être étalées sur toute la longueur d'une seule lame.

4. La fixation et coloration du prélèvement

- Le frottis doit être fixé immédiatement, alors qu'il est encore humide. La lame est plongée dans un bain de fixateur, qui peut être une solution de méthanol à 95%

Les différentes techniques de coloration :

a- Coloration au bleu de méthylène

Recouvrir le frottis de bleu de méthylène

Laisser agir 3 à 5 minutes

Rincer abondamment avec de l'eau distillée

Tamponner la lame entre 2 feuilles de papier filtre, sans frotter

b- Coloration au « Giemsa »

- Une fois les lames sèches et fixées, déposer 3 à 5 gouttes de colorant Giemsa sur la préparation et 5 à 6 gouttes d'eau distillée neutre pour neutralisation du colorant acide.

- Laisser le colorant agir 15 à 20 minutes puis rincer les lames à l'eau du robinet (faire couler

l'eau sur la tranche des lames et ne pas diriger le jet directement sur les préparations pour les préserver).

- Laisser sécher les frottis à l'air libre avant lecture de ceux-ci au microscope.

c- La coloration au May-Grünwald-Giemsa

* Après la fixation et le séchage de la lame, on met 15 gouttes de colorant May-Grünwald de façon à recouvrir totalement la lame pendant 2 minutes puis rincer avec de l'eau et passer au 2^{ème} colorant

* Recouvrir la lame par le colorant Giemsa dilué (30 gouttes de Giemsa dans 20 ml d'eau), puis rincer la lame après 20 minutes à l'eau ; laisser sécher pendant 5 minutes puis lecture du frottis.

d- La coloration de Papanicolaou

Tableau 01 : Etapes de la coloration de Papanicolaou

Ordre de passage	Produits	Temps
1	alcool à 70°	plonger 10 fois
2	alcool à 50°	plonger 10 fois
3	eau distillée	plonger 10 fois
4	hématoxyline de Harris	5 minutes
5	eau distillée	plonger 10 fois
6	alcool à 95°	passage
7	alcool à 80°	passage
8	alcool à 70°	passage
9	alcool à 70°	passage
10	Orange G 6 (1)	5 minutes
11	alcool à 95°	30 secondes
12	alcool à 95°	30 secondes
13	EA 50 (2)	5 minutes
14	alcool à 95°	30 secondes

15	alcool à 95°	30 secondes
16	alcool absolu	30 secondes
17	xylène	2 passages

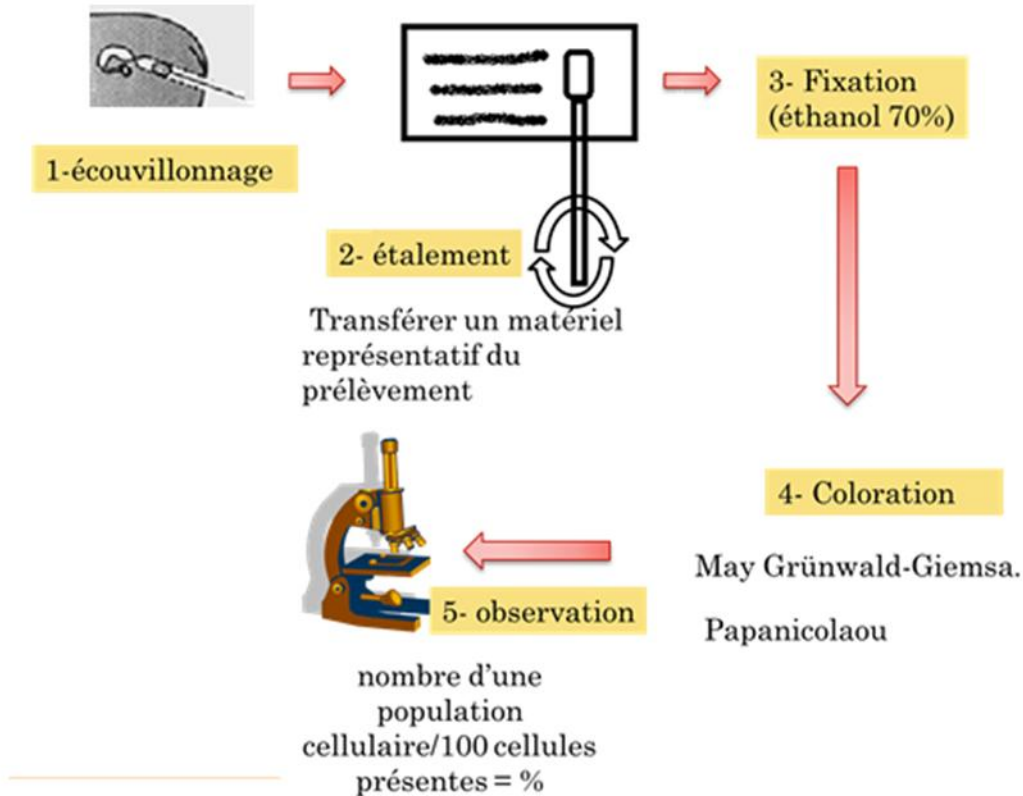


Figure 02: Etapes de réalisation de frottis vaginal chez la brebis (HadeF, 2013)

5. L'observation microscopique

L'observation de la lame se fait en deux temps (x40) pour la visualisation de la lame dans sa totalité (coloration majoritaire du frottis et la concentration cellulaire) puis par (x100) pour le typage cellulaire

Les types cellulaires :

Les cellules basales : Elles sont les précurseurs de toutes les cellules épithéliales vaginales (couche germinative). Elles sont uniformes, petites, rondes, basophiles, avec un cytoplasme peu abondant. Elles sont rarement observées sur les frottis vaginaux.

Les cellules parabasales: Elles sont les plus petites cellules épithéliales observées sur un frottis. Elles ont un rapport nucléo-cytoplasmique élevée, des noyaux rond, de taille très uniforme.

Les cellules intermédiaires:

Elles ont de très grandes variations de taille et de forme (cellules intermédiaires petite et grandes). Elles ont rapport nucléo-cytoplasmique faible

Les cellules superficielles: les plus grandes des cellules, les limites cellulaires sont anguleuses et plissées ; le noyau est pycnotique, absent, ou on ne peut distinguer que sa silhouette. Selon l'état du noyau, on peut les classer en cellules superficielle à noyau pycnotique ou des cellules superficielles kératinisées anucléées.

Nb : il est possible d'isoler d'autres types de cellules telle que : des polynucléaires neutrophiles, des hématies, des bactéries ou même des spermatozoïdes.

6. Interprétation des frottis :

La muqueuse vaginale se renouvelle à chaque cycle œstral ou menstruel. Sous l'action de l'œstradiol, les cellules de la couche basale se divisent et la muqueuse s'épaissit. Puis les assises superficielles se kératinisent. La vitesse et l'intensité de la kératinisation varient en fonction de chaque individu. C'est seulement chez la ratte que les changements cytologiques de la muqueuse vaginale sont tellement tranchés qu'ils permettent de reconnaître les périodes du cycle notamment le jour où a lieu la décharge gonadotrope ovulante et celui de l'ovulation. En effet, le frottis vaginal est composé uniquement de cellules épithéliales rondes pendant la phase folliculaire ; elles font place à des cellules plates kératinisées après la décharge de FSH/LH. Quand apparaissent quelques polynucléaires au milieu des cellules kératinisées, l'ovulation a eu lieu. Chez les autres mammifères, les populations sont moins homogènes et ne permettent pas d'identifier aussi clairement les stades du cycle ; seule varie la proportion des différents types cellulaires, le frottis n'a donc qu'une valeur indicative de l'activité ovarienne.

Par exemple, l'observation d'un frottis vaginal de chienne en œstrus au microscope montre la présence de cellules superficielles kératinisées avec des cellules intermédiaires et des globules rouges (figure 3). Le début du post-œstrus (immédiatement après l'ovulation) est marqué par un changement net de la proportion des cellules épithéliales. Le pourcentage de cellules superficielles diminue d'au moins 20%. La proportion de cellules parabasales et intermédiaires, qui étaient absentes auparavant ou inférieures à 5% du total, augmente à plus de 10 % et souvent à plus de 50%.

Chez la chèvre, de nombreux leucocytes avec un noyau compact apparaissent à l'ovulation. Enfin, chez la chatte, les modifications du frottis interviennent largement avant et après l'œstrus, en fonction du taux d'œstrogènes circulants. Le frottis permet uniquement de diagnostiquer l'œstrus grâce à l'index éosinophilique élevé, mais ne permet pas de déterminer le moment de l'ovulation.







Cell type		Pro-oestrus		Oestrus		Early metoestrus	Anoestrus	Vaginitis pyometra
		Early	Late	Early	Late			
Para basal		+++	+	-	-	-	++	±
Small intermediate		+++	++	-	-	+	+	±
Large intermediate		±	++	+++	+++	-	-	±
Anuclear keratinised		-	++	++++	+++	±	-	-
Red blood		+	+++	++	-	-	±	±
Neutrophils		+	-	-	+	+++	+	++++

Figure 03: Interprétation du frottis vaginal chez la chienne