

1553

17ème Journée d'Etude



6 Mars 1991

L'INFERTILITE CHEZ L'ETALON : Quelques explications

par CLEMENT, F., MAGISTRINI, M.*,
 HOCHEREAU de REVIERS*, M.T.,
 VIDAMENT, M*
 INSTITUT DU CHEVAL, SPP, BP 53
 22440 - PLOUFRAGAN
 * INRA, Station de Physiologie de la
 Reproduction
 37380 MONNAIE

Résumé

21 étalons avec des problèmes de fertilité ou des anomalies de l'appareil génital sont comparés à 29 étalons témoin. Les caractéristiques séminales discriminant les 2 groupes sont: concentration en spermatozoïdes (spz) $\geq 75.10^6/ml$, % de spz mobiles à la dilution, après 24 et 48 h à 4° C ≥ 50 , 25 et 10 % respectivement, % de spz anormaux ≤ 40 %, concentration en germes $< 100 \cdot 10^3/ml$ et aucun germe particulier isolé en quantité importante. La déficience de thermorégulation intratesticulaire suite à des atteintes de la tunique vaginale (adhérence, épaissement), rencontrée chez 7 des 21 étalons atteints est la seule cause de stérilité clairement élucidée.

Mots clés : Infertilité, étalon, sperme, spermatogénèse.

Summary

21 stallions with problems of fertility or genital tract anomalies are compared to 29 control stallions. Seminal characteristics which distinguish the 2 groups of animals are : concentration in spermatozoa (spz) $\geq 75.10^6/ml$, % of motile spz in diluted semen, after 24 and 48 h at 4° C ≥ 50 , 25 and 10% respectively, % of abnormal spz $\leq 40\%$, concentration of germs $< 100 \cdot 10^3/ml$ and no germ isolated in great quantity. Deficiency in testicular thermoregulation because of an increased *tunica vaginalis* or adhesions with the *albuginea* is observed on 33 % of abnormal stallions and is the only clear origine of sterility.

Key-Words : Infertility, stallion, sperm, spermatogenesis

© CEREOPA - 1991

1553

INTRODUCTION

Pour cerner la fréquence du phénomène, rappelons que :

- 15 % des étalons de race trait breton achetés chaque année par l'administration des haras, sont rendus à leur propriétaire suite à un spermogramme insuffisant (G. MARIONNEAU, communication personnelle).

- une quinzaine d'étalons nationaux (soit 1 % environ) ont été réformés en 90 pour infertilité. Les principales causes connues de stérilité seraient :

* les anomalies physiques (cryptorchidie bilatérale, torsion testiculaire)

* l'emploi d'anabolisants (KOSKINEN et al, 1991), d'hormones comme la testostérone, la LHRH (DOWSETT et al 1991)

* la dégénérescence auto-immune du parenchyme testiculaire (ZHANG et al 1990, PAPA et al 1990)

* les inflammations d'origine infectieuse ou traumatique (orchite, épидидymite et vésiculite) et ses conséquences (atrophie et fibrose du testicule, fibrose de l'épididyme, adhérences entre la tunique vaginale et l'albuginée, épaisissement de la tunique vaginale).

Cette étude analyse 29 étalons sains et 21 présentant des problèmes génitaux. Elle détermine les critères d'examen permettant de discriminer les étalons atteints des autres, puis elle établit l'étiologie de certains cas individuels de stérilité.

I - MATERIEL ET METHODES

1.1 - Les étalons

22 étalons de race lourde, 24 étalons de sang et 4 poneys provenant des haras nationaux (n = 45) ou de l'INRA (n = 5) sont étudiés. Leur âge varie de 2,5 à 21 ans ($10,7 \pm 4,5$) et leur poids de carcasse va de 140 à 578 kg (393 ± 103).

En fonction des performances de la dernière saison de monte nous avons classé les étalons en 5 groupes:

- groupe témoin (29 étalons - fertilité fin de saison > 50 %)

- groupe stérile (6 étalons - aucune fécondation)

- groupe subfertile (5 étalons - $3 \% \leq$ fertilité/cycle < 15 %)

- groupe "réformé pour infertilité" (5 étalons dont 2 n'ont jamais sailli et la fertilité/cycle des 3 autres est > 25 % !).

- groupe "autre anomalie génitale" (5 étalons fertiles mais présentant soit un engorgement des épидидymes, soit un épaisissement unilatéral du scrotum (n = 3) ou encore de minuscules testicules (1 TB avec des testicules < 60 g).

Parmi les 16 males des 3 groupes "infertiles", 12 ont été féconds auparavant et 4 TB de 3 et 4 ans n'ont jamais présenté de période fertile.

1.2 Le protocole expérimental

L'expérimentation s'étend d'août 85 à octobre 90. Certaines variations ont été apportées au fur et à mesure, ce qui explique les différences de nombre d'étalons étudiés en fonction du type d'analyse.

* un **spermogramme** est réalisé chez 49 étalons à partir de 5 éjaculats quotidiens.

* **L'analyse microbiologique de la semence** est pratiquée sur deux éjaculats de 27 étalons. La concentration en germes aérobis et l'identification des germes sont réalisées. La recherche de mycoplasmes et de chlamydiae est effectuée sur 18 étalons. Afin de standardiser cet examen, un lavage de la verge et une vidange sont pratiqués la veille de l'examen, la verge est rincée à l'eau tiède et essuyée avant la collecte, le vagin artificiel est désinfecté à l'alcool, les capotes, gants, matériel de collecte et de filtration sont stériles. La semence est conservée pure à 4° C puisensemencée dans la journée.

* **Observation de l'appareil génital** : mensurations des glandes annexes (17 étalons), pesée des testicules (42 étalons), de l'épididyme et de l'abuginée (9 étalons).

* **Etude du sperme épiddymaire** (28 étalons) :

Après dissection de la queue de l'épididyme, 5 ml d'une solution de Hanks + Hépès est rétroperfusée afin de récolter le sperme. La concentration en spz, le % de spz mobiles et anormaux sont estimés.

* **Analyse histologique des testicules** :

1 ou 2 prélèvements par testicule sont analysés à partir de 80 testicules de 42 étalons. Le parenchyme testiculaire est observé au MO. Les paramètres suivants sont mesurés :

- le volume relatif (VR) occupé par les tubes séminifères (TS) avec un réseau de HENNIG (1957) à 25 points, observé sur 20 champs ovulaires. Le % de points observés à l'intérieur des TS est considéré comme le VR,

- le diamètre moyen (D) des TS à partir de 20 sections de tubes ronds,

- la longueur (L) des TS calculée selon la formule suivante :

$$L \text{ (mètres)} = \frac{P \text{ (g)} \times VR \times (100-C)}{\pi D^2/4 \text{ (\mu m)}} \times 10^2$$

où P est le poids du testicule et C l'indice de contraction due à la fixation, estimé à 33,

- le % de TS présentant des spermatides rondes (SR), allongées (SA) ou encore aucune spermatide (= tubes vides). 100 TS sont observés par coupe.

Ces critères ont été retenus pour la rapidité de leur mesure et la haute corrélation avec les autres indices de qualité de la spermatogénèse (CHEVALIER-CLEMENT et al. 1991)

II – RESULTATS ET DISCUSSION

II.1 le sperme éjaculé

* le spermogramme

Seul le volume de l'éjaculat ne diffère pas chez les étalons atteints par rapport aux témoins ($61,2 \text{ ml} + 39,0 - n = 49$). Les autres caractéristiques séminales sont affectées. Au vu des histogrammes 1 à 5, nous proposons des seuils au-delà desquels un étalon devient suspect :

- concentration en spz inférieure à $75 \cdot 10^6/\text{ml}$ qui concerne 75 % des étalons atteints contre 0 % des témoins.
- % de spz mobiles dans la semence diluée inférieur à 50 % : 80 % des mâles atteints contre 11 % des témoins.
- % de spz mobiles après 24 H inférieur à 25 % : 100 % des étalons atteints contre 7 % des témoins.
- % de spz mobiles après 48 H inférieur à 10 % : 100 % des étalons atteints contre 4 % des témoins.
- % de spz anormaux supérieur à 40 % : 65 % des étalons atteints contre 21 % des témoins. Aucun type d'anomalie pris individuellement ne permet une meilleure discrimination que le % total.

Le spermogramme d'un étalon atteint, présente 2 à 5 des paramètres cités ci-dessus défectueux ($4,05 + 0,76$) contre 0 à 4 ($0,39 + 0,86$) chez les animaux témoin. Nous pouvons proposer la règle du jeu suivante :

- 0 ou 1 paramètre défectueux : *étalon accepté à la monte*
- 2 à 5 paramètres défectueux : *étalon refusé à la monte.*

Ainsi, 2 des 28 étalons sains auraient été rejetés à-tort et aucun étalon atteint n'aurait été accepté. Notons qu'il s'agit ici de discriminer les étalons aptes ou non à la monte. Ces seuils seraient certainement plus exigeants si on parlait d'une exploitation de l'étalon en IA de sperme frais ou surtout congelé.

* l'analyse bactériologique

17 espèces de germes ont été identifiés à partir de 52 éjaculats de 27 étalons (hist. 6). Chaque éjaculat contient 2 à 6 espèces différentes ($3,1 + 0,9$). Des mycoplasmes ont été isolés chez 5 sur 18 étalons sans relation avec la fertilité. Aucun éjaculat n'a révélé la présence de chlamydiae.

La concentration en germes aérobies varie beaucoup entre les étalons (hist. 7) mais est répétable entre les éjaculats d'un même cheval : le coefficient de corrélation reliant la concentration du 1er et du 2ème éjaculat vaut 0,72 ($n = 25$). La concentration ne diffère pas significativement entre les groupes d'étalons même si une infection bactérienne est certainement à l'origine de certains cas de stérilité.

2 cas d'infection du sperme sont observés : *Streptococcus zooepidemicus* et *Streptococcus equisimilis* sont les agents responsables dans l'un et l'autre cas. Ils sont isolés en quantité importante et la concentration en germes des 4 éjaculats concernés est élevée (242 à $1170 \cdot 10^3/\text{ml}$).

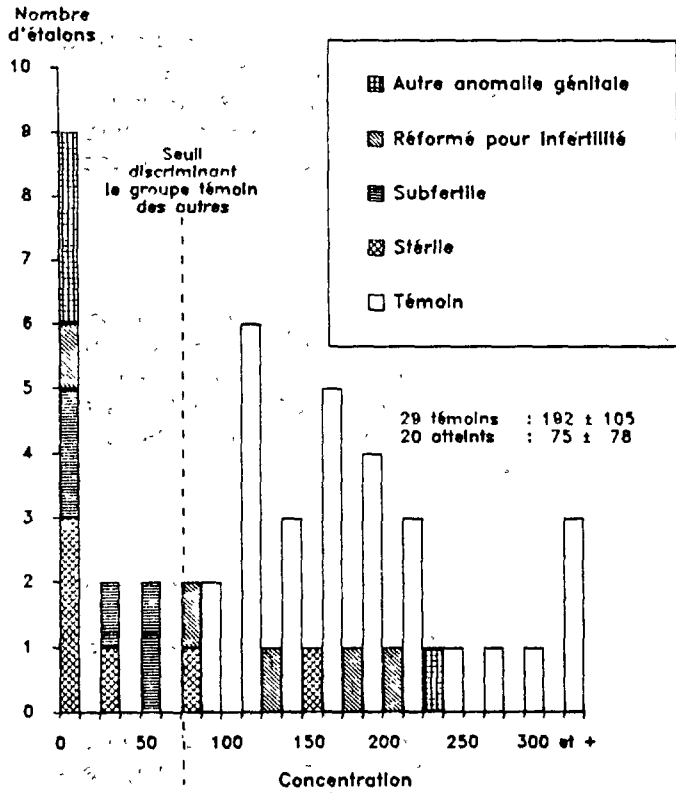
Au vu de ces données, nous proposons le protocole suivant pour interpréter une analyse bactériologique de sperme :

- effectuer la collecte dans les conditions décrites ci-dessus,

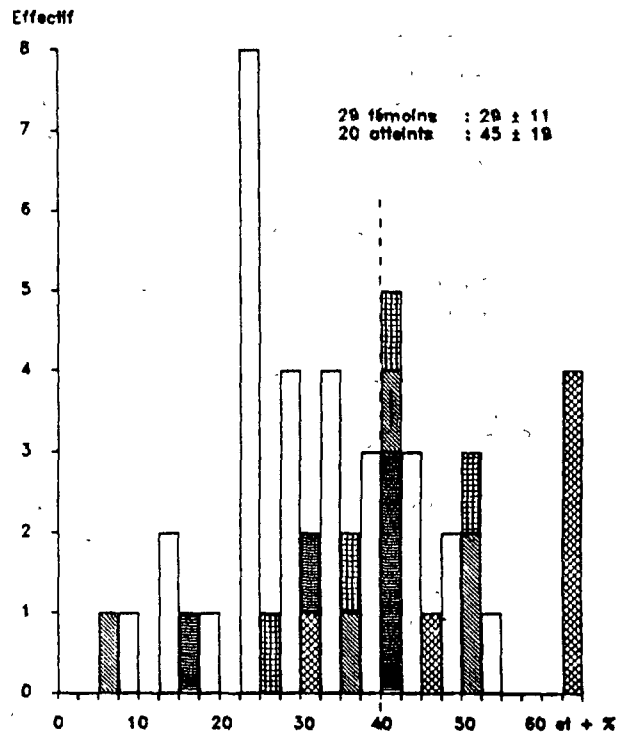
Répartition des étalons en fonction du groupe et des caractéristiques séminales

Repartition of stallions according to the group and seminal characteristics

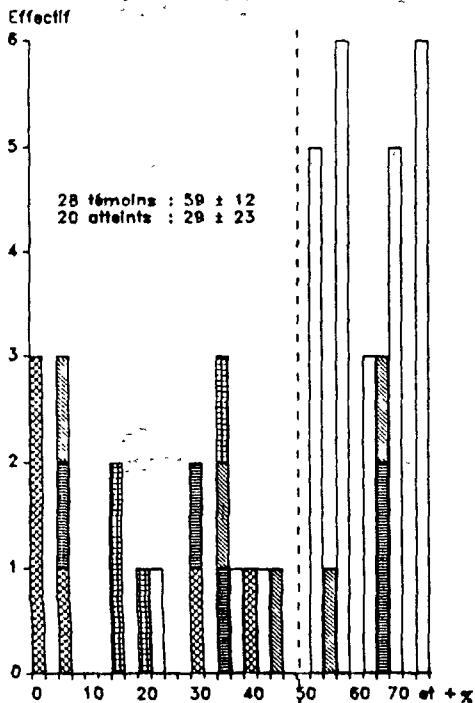
Hist. 1 : Concentration de la semence (10^6 spz/ml)
Semen concentration (10^6 spz/ml)



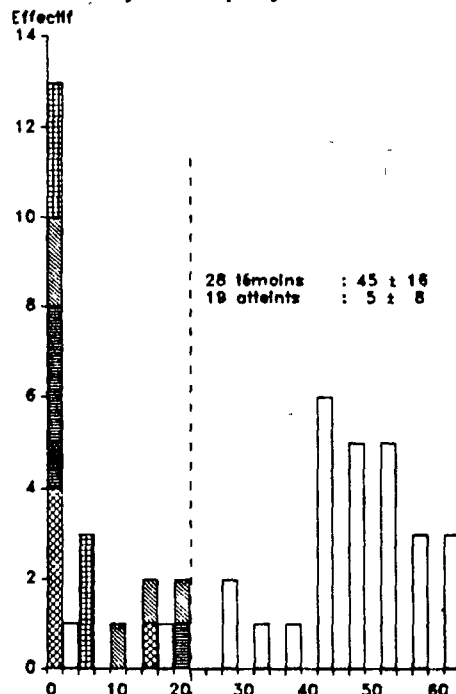
Hist. 5 : % de spz anormaux
% of abnormal spz



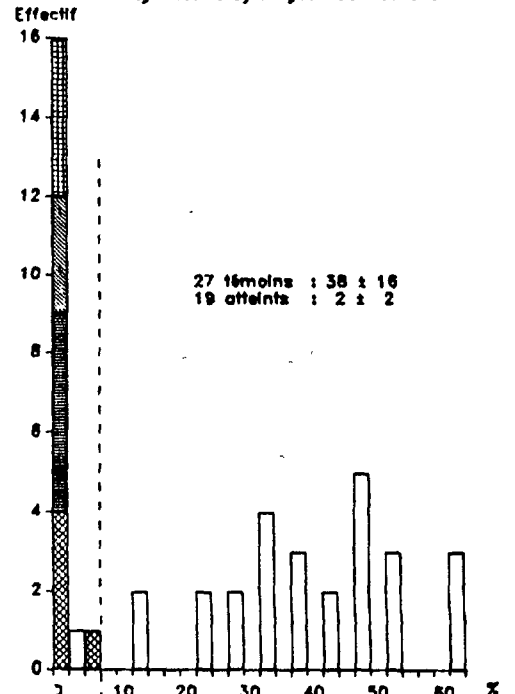
Hist. 2 : % de spz mobiles dans la semence diluée
% of mobile spz in diluted semen



Hist. 3 : % de spz mobiles après 24h à 4°C
% of mobile spz after 24h at 4°C



Histo 4 : % de spz mobiles après 48h à 4°C
% of mobile spz after 48h at 4°C



- considérer comme suspect une concentration en germes aérobies supérieure à $100.10^3/\text{ml}$ avec l'isolement d'un germe en quantité importante.

II.2 - Les examens post-mortem

* L'examen macroscopique de l'appareil génital

Le poids moyen des testicules, de l'albuginée et de l'épididyme valent respectivement $235 \text{ g} \pm 94$ ($n = 72$), 42.6 ± 17.4 ($n = 18$) et $43.7 \text{ g} \pm 17.5$ ($n = 18$). Les côtés droit et gauche d'un même animal ont des poids similaires ($r = 0.94, 0.87$ et 0.91 respectivement). Ces poids sont supérieurs aux données de SWIERSTRA et al, (163, 25 et 20 g) probablement par le format des chevaux plus importants et éventuellement la présence de certaines pathologies. Les mensurations réalisées sur les glandes annexes sont données Figure I.

* Le sperme épидидymaire

Chez les 19 étalons témoin, le sperme épидидymaire est très concentré ($6.44 \cdot 10^9 \pm 5.37 \text{ spz/ml}$). Le % de spz mobiles est de 45 ± 22 et le % de spz anormaux est élevé (42 ± 11) dû à la présence d'une proportion encore élevée de gouttelettes cytoplasmiques ($28 \% \pm 15$). Chez les étalons atteints, les détériorations sont identiques à celles du sperme éjaculé : l'intérêt de cet examen est de discriminer la production d'un testicule par rapport à l'autre et de mieux cerner l'endroit de l'altération des spz en cas de discordance entre la spermatogénèse et le sperme éjaculé.

* L'examen histologique des testicules

Le tableau 1 présente les relations entre les différents paramètres. Le défaut de spermatogénèse est apprécié par le % de tubes vides, seul critère opposé aux paramètres "qualité de la spermatogénèse" (% de tubes à SR, à SA, diamètre et VR des TS). Le poids testiculaire et la longueur des TS sont peu ou non reliés aux critères précédents.

Les coefficients de corrélation reliant les 2 prélèvements d'un même testicule et ceux reliant 2 testicules d'un même étalon, montrent que la qualité de la spermatogénèse est très homogène à l'intérieur d'un testicule et dans une moindre mesure reste corrélée à celle du testicule opposé.

En comparant les valeurs obtenues dans les 38 testicules des étalons atteints aux 42 testicules témoin, on note chez les premiers :

- une diminution du diamètre des TS ($192 \mu\text{m} \pm 27$ contre 214 ± 17), du volume relatif ($61,9 \% \pm 12,1$ contre $70,9 \pm 3,7$), du % de tubes à SR ($57,7 \pm 24,3$ contre $69,5 \pm 10,3$) et à SA ($50,6 \pm 25,1$ contre $59,9 \pm 11,0$),
- une élévation du % de tubes vides ($23,2 \pm 32,1$ contre $6,4 \pm 6,9$)
- une longueur de TS ($3311 \text{ m} \pm 1430$) et un poids testiculaire ($235 \text{ g} \pm 94$) identiques dans les 2 groupes.

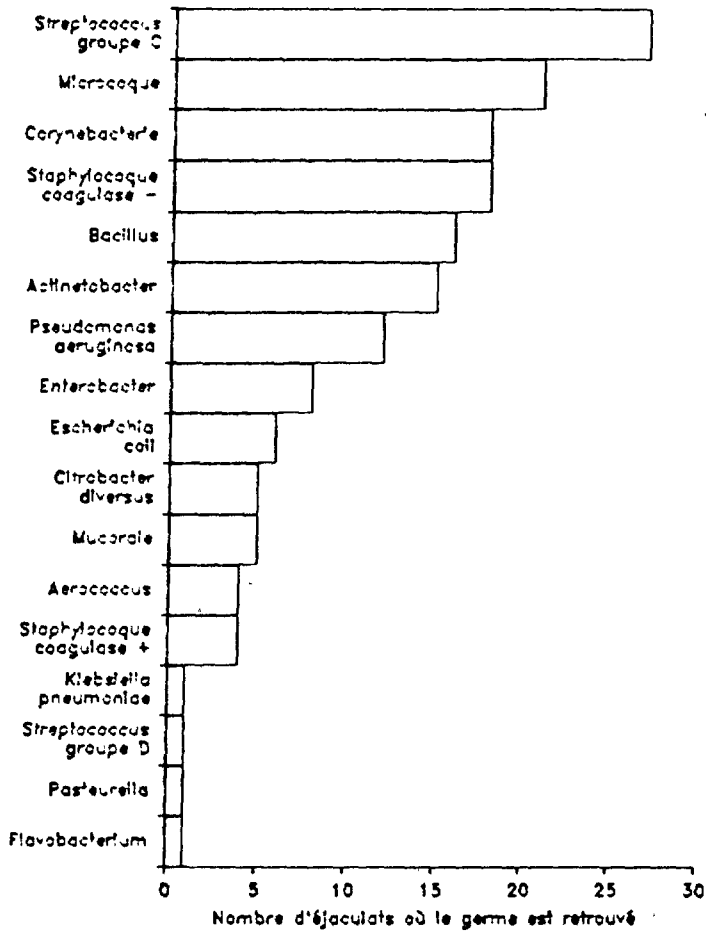
II.3 Hypothèses étiologiques sur la perte du pouvoir fécondant

* Déficience dans la thermorégulation du testicule

Pour que la spermatogénèse s'effectue normalement, le testicule doit être maintenu à une température inférieure à 35°C . 2 degrés supplémentaires suffisent à altérer la spermatogénèse

Hist. 6 : Type de germes identifiés dans la semence
(52 éjaculats de 27 étalons)

Different species of germs in semen



Hist. 7 - Répartition des étalons en fonction de la concentration en germes (10^3 /ml) de la semence (moyenne des 2 éjaculats/étalon)

Concentration of germs (10^3 /ml) in semen

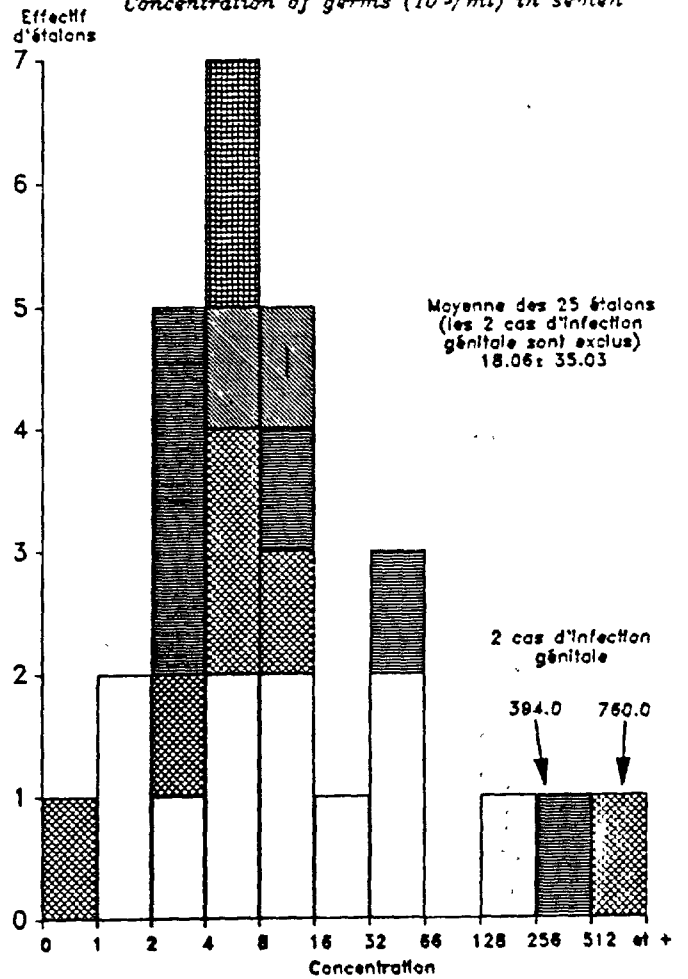
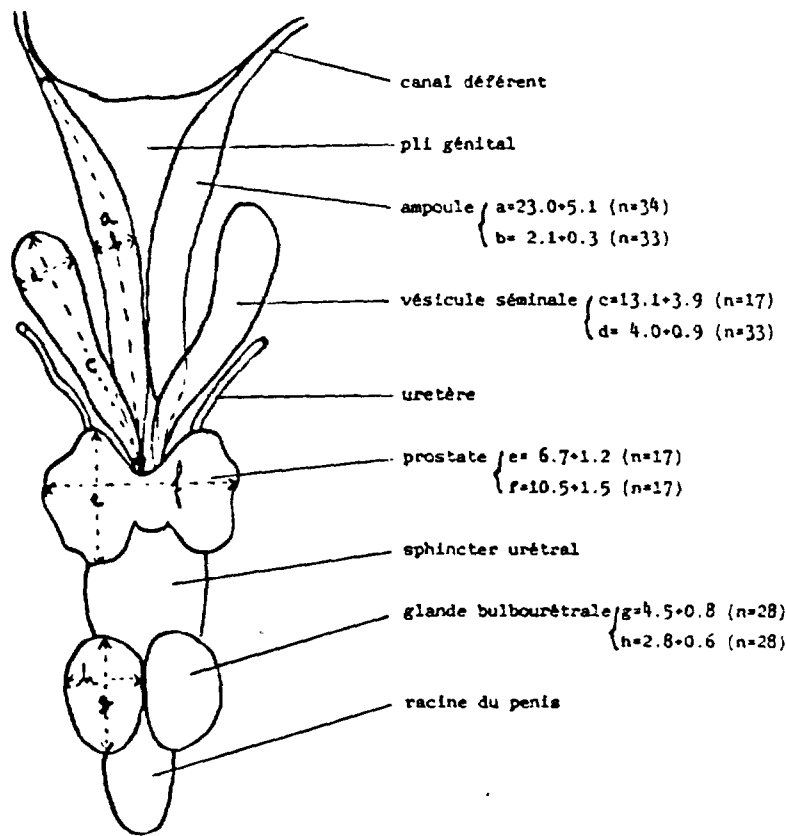


Fig. 1: Taille (en cm) des glandes annexes de l'appareil génital d'étalon
Size of the accessory sex glands of the stallion.



Vue dorsale

**Tableau 1 : Coefficients de corrélation reliant les différents paramètres mesurés dans le parenchyme testiculaire.
Correlation coefficients between the parameters of the testicular gland.**

	corrélation entre les paramètres						relation entre 2 prélèvements d'1 testicule	relation entre 2 testicules d'1 étalon
	VR	Longueur	% tubes vides	% tubes à SR	% tubes à SA	Poids		
Diamètre des TS	0,41	-0,26	-0,58	0,59	0,54	NS	0,95	0,76
VR		0,32	0,67	0,65	0,54	0,32	0,88	0,66
Longueur des TS			NS	NS	NS	0,85	-	0,90
% de tubes vides				-0,93	-0,89	-0,26	0,96	0,61
% de TS à SR					0,83	0,29	0,85	0,53
% de TS à SA						0,29	0,97	0,63
poids testicule							-	0,94
effectif	71 ≤ n ≤ 79						n = 18	34 ≤ n ≤ 38

(Friedman et al., 1991). Il est logique de penser qu'une telle élévation de température s'est produite chez:

- 2 étalons présentant d'importantes adhérences entre la tunique vaginale et l'albuginée empêchant la remontée et la descente testiculaire.
- 5 étalons présentant une tunique vaginale épaissie de 2 à 10 cm unilatéralement (n=3) ou bilatéralement (n=2).

La spermatogénèse est très atteinte dans tous les testicules concernés (72% ± 32 tubes vides).

Les 3 chevaux présentant 1 seul des 2 testicules englobé dans cet épais scrotum ont une spermatogénèse normale dans le testicule opposé: ceci illustre l'indépendance entre les 2 testicules et explique la fertilité de ces étalons anormaux.

Un traumatisme (coup de pied, morsure) est à l'origine de ce processus chez 3 étalons. Même si une contamination bactérienne a certainement accompagné ces périorchites, la concentration en germes de la semence n'est pas augmentée chez ces 7 étalons illustrant l'ancienneté des lésions.

* Contamination bactérienne de l'appareil génital

Chez les 2 mâles présentant une semence avec plus de 200×10^3 germes par ml et un Streptocoque du groupe C en quantité importante, nous avons effectué une recherche bactériologique à partir des ampoules et glandes annexes. Un étalon présentait la vésicule séminale gauche pleine de pus à *Streptococcus zooepidemicus*. Le cas de l'autre étalon est moins clair : présence de *Streptococcus equisimilis* dans tout l'appareil génital mais en faible quantité

* Disparition des spermatozoïdes entre le testicule et l'éjaculat ?

2 étalons avec des testicules de taille correcte (> 230 g) et fonctionnant presque normalement (9 à 26 % de tubes vides) éjaculent un sperme contenant très peu de spermatozoïdes (0,4 ou $0,09 \times 10^9$). Le sperme épидидymaire n'a hélas été observé que chez un cheval qui enregistre déjà à ce stade une très faible concentration ($0,63 \times 10^9$ /ml).

Dans des études ultérieures, il convient d'approfondir par histologie le *rete testis*, la tête et corps de l'épididyme pour savoir si des fuites ou réabsorptions de spz peuvent se produire à ce niveau?

* Effet age

2 étalons de 17 et 21 ans se sont retrouvés infertiles avec 1 sperme sensiblement altéré (3 et 4 paramètres défectueux) et un parenchyme testiculaire subnormal (12 à 20% de tubes vides). Cet Effet âge est illustré par la figure II qui montre la baisse régulière de fertilité en fonction de l'âge chez les mâles de plus de 15 ans.

La recherche des anticorps anti-spz permettrait d'apprécier si l'effet âge s'apparente à une dégénérescence auto-immune du parenchyme testiculaire.

* Développement testiculaire Incomplet

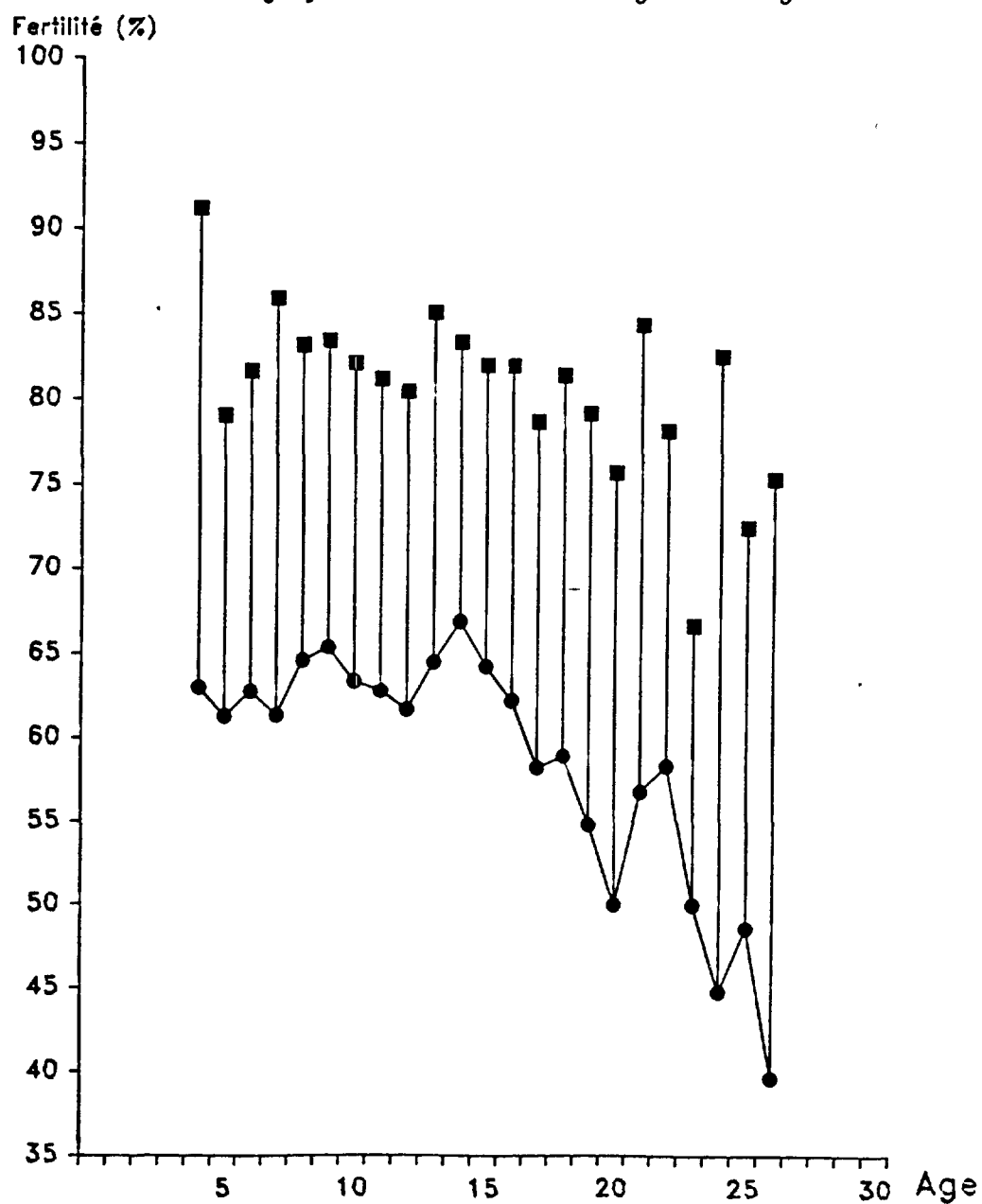
2 étalons de race TB fertile ou l'ayant été présentent des testicules minuscules ($67,2 \pm 19,3$ g) avec un parenchyme testiculaire normal (diamètre des TS = $213 \mu\text{m} \pm 19$, VR = $61\% \pm 15$ et % de tubes vides = $12\% \pm 4$). Le développement testiculaire aurait été stoppé avant la fin de la puberté puisque le nombre de cellules de Sertoli est faible et que la multiplication des cellules de Sertoli s'arrête à la puberté.

En conclusion, parmi les 21 étalons atteints, 8 cas restent inexplicables: la spermatogénèse est pratiquement normale ($5,9\% \pm 6,6$ - tubes vides), aucune lésion de l'appareil génital n'est observée et pourtant le sperme présente 2 à 5 paramètres défectueux. Sont concernés les 4 jeunes TB classés infertiles dès leur 1^{ère} saison et/ou les 5 étalons réformés pour infertilité. Les 13 étalons restants peuvent présenter simultanément plusieurs pathologies expliquant un nombre de cas décrits ci-dessus supérieur à 13.

Fig. II - Fertilité des étalons (TF, AA et SF) en fonction de leur âge (monte 88)

$$\left(\text{Fertilité} = \frac{\text{Nbre de naissance} + \text{nbre d'avortements}}{\text{nbre de juments saillies}} \times 100 \right)$$

Fertility of the stallions according to the age



BIBLIOGRAPHIE

CHEVALIER-CLEMENT F., HOCHEREAU DE REVIEB M.T., PERREAU C., MAGISTRINI M. 1991. Alterations of the semen and the genital tract of infertile stallions. *J. Reprod Fert Suppl.* (sous presse).

DOWSETT K.F., PATTRE W.A., KNOTT L.M.; HOSKINSON R.M., 1991. A preliminary study of reversible immunological castration in colts. *J. Reprod Fert Suppl.* (sous presse).

FRIEDMAN R., SCOTT M., HUGHES J.P., HEATH S.E., DAELS P.F., 1991. The effect of increased testicular temperature on the semen evaluation of the stallion. *J. Reprod. Fert Suppl* (sous presse).

HENNIG A., 1957. Das Problem der Kernmessung eine Zusammenfassung und Erweiterung des Mikroskopischen Messtechnik. *Mikroskopie*, 12, 174-203.

KOSKINEN E., KARKKU P., KATILA F., 1991. Effect of an anabolic steroid on testes of colts. *J. Reprod. Fert. Suppl.* (sous presse).

PAPA F.O., ALVARENGA M.A., LOPES M.D., FILHO CAMPOS E.P., 1990. Infertility of autoimmune origine in a stallion. *Equine Vet. J.*, 22 (2) 145-146.

SWIERSTRA E.E., GEBAUER M.R., PICKETT B.W., 1974. Reproductive physiology of the stallion. I.Spermatogenesis and testis composition. *J. Reprod. Fert.* 40 113-123.

ZHANG J., RICKETTS, S.W., TANNER S.J. 1990. Antisperm antibodies in the semen of a stallion following testicular trauma. *Equine Vet. J.* 22 (2) 138-141.