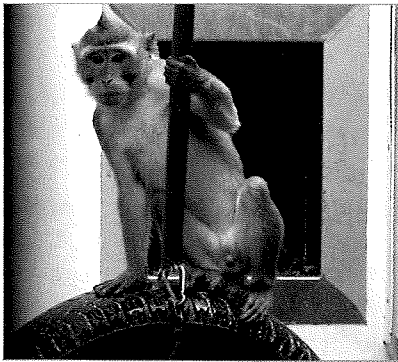


ARTICLES

Réalisation pratique du prélèvement de sperme par électro-éjaculation chez le macaque cynomolgus (*Macaca fascicularis*)



Crédit photo : UAR

■ **Floriane Tardy, Fanny Bellebeau**
Ricerca Biosciences SAS,
 69210 Saint Germain sur l'Arbresle, France

Mots-clés : primates, maturité sexuelle, électro-éjaculation, analyse de sperme.

Abréviations : spz = spermatozoïdes.

Résumé

Dans le cadre de l'évaluation de la sécurité des médicaments, certains protocoles nécessitent d'effectuer un prélèvement de sperme, pour évaluer la maturité sexuelle des macaques mâles avant inclusion en étude, ou pour en faire l'analyse dans le cadre d'études concernant des molécules avec des effets potentiels sur la spermatogénèse.

Si ce prélèvement est aisément réalisable par massage manuel du pénis et du fourreau chez le chien vigile, chez le macaque, insuffisamment docile, une anesthésie générale est indispensable. La seule méthode applicable chez le macaque est l'électro-éjaculation. Rapide et efficace, elle permet de prélever de grands effectifs, à l'échelle d'une étude d'évaluation de la sécurité du médicament de 12 à 24 animaux, en un temps raisonnable (15 minutes par

animal). Parfois, elle peut cependant entraîner certaines complications éthiquement regrettables, ce qui rend indispensable de la réaliser précautionneusement, et dans le plus grand respect de l'animal.

Introduction

Le prélèvement de sperme chez le macaque, principalement utilisé pour objectiver la maturité sexuelle des mâles, peut également servir à mettre en évidence un éventuel effet produit sur la spermatogénèse.

L'électro-éjaculation, utilisée chez le macaque, est classiquement décrite dans la littérature pour la récolte du sperme à des fins d'insémination artificielle chez l'Homme, notamment dans le cas particulier de l'homme tétraplégique (Brackett and al, 2010) et utilisée sur les félins dans les centres d'insémination artificielle vétérinaires. Par ailleurs, elle est utilisée chez les animaux de rente comme le taureau pour la fabrication de paillettes de sperme lorsque les animaux ne peuvent être récoltés au moyen d'un vagin artificiel (défauts d'érection normale, lésions articulaires ou refus du vagin) (Hanzen C., 2008-2009). Cette méthode a également été utilisée chez l'hippopotame à des fins de préservation de l'espèce (Saragusty and al, 2010).

Cette méthode permet de provoquer l'éjaculation par stimulation électrique de la prostate. Il s'agit d'une méthode efficace, rapide et relativement facile à mettre en œuvre.

Cet article se propose de détailler la réalisation pratique de cet examen.

Matériel et méthode

Animaux

L'électro-éjaculation est réservée aux animaux respectant les critères suivants :

- > Agés de plus de 48 mois.
- > Poids supérieur à 2.5 kg.
- > Taille des testicules supérieure à 2 x 3 cm.

Dans notre expérience, il est exceptionnel que des animaux ne correspondant pas à ces critères s'avèrent matures.

Appareil

L'appareil que nous utilisons est un stimulateur électrique (XF003-1, P.t. Electronics®) muni d'un variateur d'intensité sur lequel est branchée une sonde endorectale avec trois électrodes de stimulation de diamètre 0.8 cm (Intellibio®).

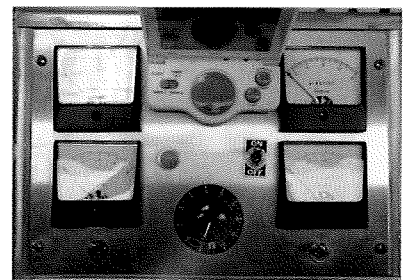


Photo 1 : Stimulateur électrique XF003-1

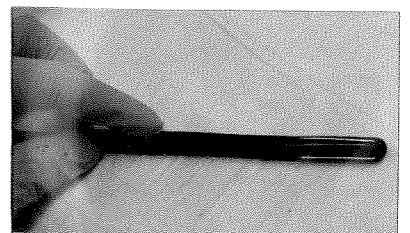


Photo 2 : sonde endorectale « tri-électrodes »

Protocole

Le protocole d'électro-éjaculation est décrit dans nos Procédures Standards Opératoires et a été revu en interne par notre Comité d'Éthique en Expérimentation Animale.

La manipulation nécessite trois opérateurs, un pour placer la sonde et la maintenir en place le temps du protocole, un pour manipuler le stimulateur électrique et un dernier pour récolter l'éjaculat en fin de protocole. Elle dure de 10 à 15 minutes une fois l'animal anesthésié.

La manipulation se décompose selon les étapes suivantes (7 étapes).

1. Anesthésie de l'animal par injection intramusculaire avec un mélange kétamine (10 mg/kg) et xylazine (0.7 mg/kg).

2. Positionnement de l'animal en décubitus dorsal.

3. Introduction de la sonde recouverte de gel conducteur dans le rectum de l'animal, l'électrode centrale devant être placée contre la paroi ventrale du rectum, contre la prostate.

Afin d'avoir une stimulation efficace, la sonde doit être enfoncée de 5 à 6 cm dans le rectum. Pas assez enfoncée ou mal orientée, la sonde peut ne pas stimuler la prostate mais entraîner une stimulation excessive des muscles des membres postérieurs et donc l'extension de ces membres. Si nécessaire, le technicien prend le temps d'effectuer une vidange rectale par taxis externe.

4. Maintien de la sonde et du pénis. Préalablement à la manipulation, l'extrémité du pénis est nettoyée avec une compresse humide. Au cours de

la manipulation, le technicien qui maintient la sonde en place, maintient également le pénis et peut, au besoin, extérioriser le gland au cours de la manipulation ; la récolte de sperme par le troisième technicien peut en être facilitée.



Photo 3 : positionnement de l'animal et de la sonde

5. Stimulations

La méthode consiste à stimuler la prostate de l'animal à plusieurs reprises, à plusieurs paliers d'intensité. Lors des premières stimulations, une fraction liquide transparente peut être observée ; c'est le liquide séminal qui ne doit pas être recueilli. Les impulsions suivantes permettent en général de recueillir une fraction plus épaisse, le sperme.

Pour chaque stimulation, à l'aide du variateur de tension, la tension voulue est atteinte progressivement en 2 secondes, puis maintenue 3 secondes, puis abaissée à zéro en une seconde. Une pause de 2 secondes est ensuite observée.

Plusieurs cycles sont réalisés en augmentant l'intensité de la stimulation : > soit par des cycles d'un nombre fixe de 10 stimulations : 10 stimulations de 2V à 10V en augmentant progressivement de volt en volt. Comme l'éjaculation a généralement lieu tôt avec cette méthode, le nombre de stimulation reste limité. A la fin de chaque série, la dixième mise sous

tension doit être maintenue 30 secondes puis suivie d'une pause de 30 secondes avant de redémarrer avec un nouveau voltage.

> soit par des cycles de nombre variable de stimulations : d'abord de 3 stimulations à 1V, puis de 3 stimulations à 2V, puis de 5 stimulations à 4V, puis de 10 stimulations à 8V puis à 10 V.

Dans notre expérience, le premier protocole nous semble le plus fiable : il aboutit plus régulièrement et plus rapidement à une électro-éjaculation, avec une intensité moins importante. L'éjaculation se produit généralement entre 4 à 8 V. Le protocole s'arrête dès récolte du sperme.

6. Récolte de l'éjaculat

L'éjaculat est recueilli dans un milieu de survie pour spermatozoïdes (tube Eppendorf). Le milieu utilisé est un milieu 199 enrichi de BSA 1% placé préalablement au bain-marie à 37°C. Le volume recueilli est faible : la plupart du temps de 1 à 2 gouttes.

7. Suivi de l'animal

Après le prélèvement, il faut bien vérifier à l'extrémité du pénis de l'animal qu'il ne reste plus de substance filamenteuse susceptible de favoriser le développement d'une infection urinaire. Dans ce cas, il est indispensable de procéder à un nettoyage avec une compresse humidifiée.

Dans les jours qui suivent la manipulation, l'animal est maintenu sous surveillance notamment en ce qui concerne miction et défécation.

Complications éventuelles

Outre les infections urinaires aisément prévenues par le nettoyage du pénis, la manipulation peut entraîner

ARTICLES

des lésions de la muqueuse rectale pouvant aller de l'irritation jusqu'à la nécrose avec perforation rectale. En respectant scrupuleusement le protocole (diamètre de la sonde, utilisation de gel, augmentation progressive de la stimulation et arrêt de la stimulation à 10V), ces dernières complications restent exceptionnelles.

Résultats : recueil et utilisation de l'éjaculat

Deux types d'analyses peuvent être réalisés à partir de l'éjaculat recueilli :

- > soit une simple vérification de la présence ou non de spermatozoïdes dans le cadre de la vérification de la maturité sexuelle des animaux,
- > soit une analyse plus poussée dans le cadre d'investigations concernant un éventuel effet produit (à l'aide d'un analyseur de sperme).

Vérification de la maturité sexuelle des animaux

L'éjaculat recueilli est étalé sur une lame et observé au microscope (grossissement x40) pour une évaluation semi-quantitative :

- > + : quelques dizaines de spermatozoïdes mobiles.
 - > ++ : quelques centaines de spermatozoïdes mobiles.
 - > +++ : plusieurs milliers de spermatozoïdes mobiles, ou grouillement.
- Quel que soit leur nombre, en la

présence de spermatozoïdes mobiles dans l'éjaculat, l'animal est considéré comme mature. Dans le cas inverse, l'animal est considéré comme immature.

Investigations avancées

Une microgoutte de l'éjaculat recueilli dans le milieu de conservation est placée entre lame et lamelle puis analysée par un analyseur électronique (Hamilton Thorne®, programme « Animal Motility ») qui détermine les paramètres suivants :

- > Nombre total de spermatozoïdes, et
- > Nombre et pourcentage de spermatozoïdes mobiles, lents ou immobiles.

L'analyse porte sur 5 champs à une température de 37°C environ (tableau I).

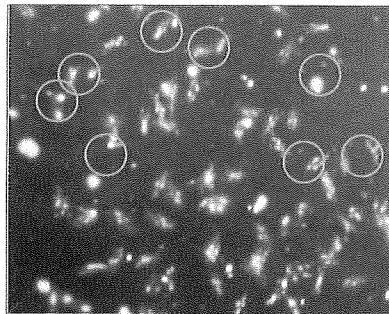


Photo 4 : image obtenue grâce à l'analyseur (spermatozoïdes entourés)

Conclusion

La maturité sexuelle survient à un âge sensiblement variable d'un individu à

l'autre. Or dans les études d'évaluation de la sécurité du médicament, l'un des critères fondamentaux d'inclusion des animaux en étude est la maturité sexuelle (notamment pour les études concernant des molécules ayant de potentiels effets sur la spermatogénèse). Sa détection la plus précise possible est donc primordiale et cette méthode d'électro-éjaculation nous a permis d'affiner nos critères de maturité sexuelle du macaque cynomolgus mâle en associant des critères morphologiques (poids de l'animal et taille des testicules) à des critères biologiques (présence ou non de spermatozoïdes mobiles dans l'éjaculat des animaux).

Bibliographie

BRACKETT NL., IBRAHIM E., IREMASHVILI V., ABALLA TC., LYNNE CM. (2010). Treatment for ejaculatory dysfunction in men with spinal cord injury: an 18-year single center experience. *The Journal of urology*, 183 (6), 2304-2308.

HANZEN C. (2008-2009). Cours sur la propeédeutique de l'appareil reproducteur et de l'examen de sperme des ruminants, Faculté de Médecine Vétérinaire à Liège.

SARAGUSTY J., HILDEBRANDT TB., BOUTS T., GÖRITZ F., HERMIES R. (2010). Collection and preservation of pygmy hippopotamus (*Choeropsis liberiensis*) semen. *Theriogenology*, 21 april 2010.

	Négatif		Légèrement positif		Positif	
	Spz	%	Spz	%	Spz	%
Total	26	100	453	100	1010	100
Mobiles	0	0	343	76	706	70
Lents	0	0	63	14	147	15
Immobiles	26	100	47	10	157	16
Maturité	Singe non mature		Singe mature		Singe mature	

Tableau I : exemples d'analyses de sperme (spz = spermatozoïde)