

19ème Journée d'Etude



3 Mars 1993

**Etude de la mobilité et de la motilité des spermatozoïdes du Baudet du Poitou
en vue d'améliorer leur congélation**

**TRIMECHE (A)*, BESSE (P)*,
BERCEGEAY (S)**, BARRIERE (P)**,
BRUYAS (J. F.)*, FIENI (F)* et
TAINTURIER (D)***

* Service de Pathologie de la Reproduction,
Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes -
Case Postale 3013
44087 Nantes CEDEX 03.

**Laboratoire de Biologie de la Reproduction,
CHU Nantes, 44035 NANTES CEDEX 01.

Résumé

L'étude de la mobilité et de la motilité des spermatozoïdes du Baudet du Poitou frais et après congélation-décongélation, réalisée à l'aide d'un analyseur d'images ATS 40 montre que :

- le milieu INRA 82 modifié par l'addition de 2% de jaune d'oeuf de caille est satisfaisant ;
- la concentration de 4% de glycérol est généralement meilleure que les autres concentrations;
- la technique sans centrifugation permet de simplifier le protocole de congélation de la semence du Baudet du Poitou, d'éviter une perte des spermatozoïdes dans le surnageant et des fractures de la queue et améliore leur mobilité et motilité après congélation-décongélation.

**MOTS CLES : BAUDET DU POITOU, SPERMATOZOIDE, CONGELATION, ANALYSEUR
ATS 40.**

Summary

The study of mobility and motility of the Poitou donkey's spermatozoa fresh and after freezing-thawing realised with analysis system computer ATS 40, shows that :

- The INRA 82 medium modified with 2% quail's egg yolk is satisfactory ;
- The concentration of 4% glycerol is generally better than the other concentrations ;
- The technique without centrifugation makes it possible to simplify the protocol of freezing of the Poitou donkey's semen, to avoid a loss of spermatozoa in the supernatant and fractures of the end piece and improve their mobility and motility after freezing - thawing.

**KEY-WORDS : POITOU DONKEY, SPERMATOZOA, FREEZING, ANALYSIS SYSTEM
COMPUTER ATS 40.**



I - INTRODUCTION

La congélation de semence des espèces domestiques s'est développée à la suite des travaux de POLGE en 1949 qui a mis en évidence le rôle protecteur du glycérol. Mais les paramètres de la congélation de la semence doivent être adaptés à chaque espèce et en particulier au Baudet du Poitou qui fait l'objet de cette étude.

II - MATERIELS ET METHODES

A - Animaux

Deux Baudets du Poitou âgés de 4 et 5 ans, pesant 300 et 350 kg sont destinés à produire de la semence et une ânesse âgée de 4 ans, de 250 kg, maintenue en chaleur par injection régulière d'oestrogènes (hexahydrobenzoate d'oestradiol 2,5 mg) toutes les 48 heures, sert de bout en train pour le chevauchement. Le sperme est récolté à l'aide d'un vagin artificiel de type fermé.

B - Examen du sperme frais

Le sperme est filtré aussitôt après prélèvement, observé ensuite au microscope optique muni d'une plaque chauffante à 37°C. La vitalité est déterminée par la coloration d'éosine-nigrosine. La concentration des spermatozoïdes par ml est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre réglé sur 546 nm et qui a été étalonné après une série de comptages à l'hématimètre de Malassez. Le pH est mesuré avec un pH-mètre étalonné à l'aide de deux solutions de pH 4 et 7 respectivement.

C - Préparation du sperme congelé

La congélation du sperme est effectuée selon deux protocoles en utilisant ou non la centrifugation.

1 - Congélation

a - Avec centrifugation

Le sperme récolté est filtré à travers une gaze dans un récipient placé dans un bain marie à 37°C, puis il est dilué au 1/5ème dans le milieu INRA 82 additionné :

- soit de 2% de jaune d'oeuf de poule,
- soit de 2% de jaune d'oeuf de caille.

Le mélange est refroidi à l'aide d'un congélateur programmable à la vitesse de 0,5° C par minute de + 37° C à + 4°C.

Le sperme est centrifugé à la vitesse de 800 g pendant 10 minutes, le surnageant est enlevé.

Le culot de spermatozoïdes est dilué pour obtenir une concentration de $100 \cdot 10^6$ spermatozoïdes par ml dans le dilueur INRA 82 au jaune d'oeuf de poule ou celui de caille et additionné de 2, 3, 4 ou 5% de glycérol respectivement, ce qui permet finalement de tester huit compositions différentes de dilueur.

Après avoir laissé le sperme en contact avec ces différents dilueurs pendant 30 minutes, les échantillons sont conditionnés en paillettes de 1 ml qui sont bouchées avec de l'alcool polyvinylique en poudre.

La congélation des paillettes s'effectue sur une rampe horizontale, placée dans les vapeurs d'azote à 4 cm du liquide pendant 10 minutes. Puis elles sont stockées à - 196°C.

b - Sans centrifugation

Le sperme est dilué au 1/5ème avec du dilueur INRA à 37°C et additionné de jaune d'oeuf de poule ou de caille et de glycérol aux différentes concentrations envisagées. Lorsque la température atteint + 4°C, les spermatozoïdes sont dilués avec le dilueur à cette même température pour obtenir la concentration souhaitée.

2 - Décongélation

La décongélation des paillettes s'effectue par immersion pendant 30 secondes dans un bain marie à 37°C.

3 - Examen

Dans les deux protocoles, une goutte de sperme est examinée sur une lame de verre placée sur platine chauffante pour évaluer la mobilité des spermatozoïdes au microscope (x 200).

Une autre goutte est examinée à l'analyseur d'images ATS 40, trois champs sont traités à la vitesse de 20 images par seconde pour calculer la concentration de spermatozoïdes, le pourcentage de spermatozoïdes mobiles (mobilité) et la linéarité (rapport de la vitesse progressive sur la vitesse curviligne). Les données sont saisies sur Excel version 3 et le traitement statistique réalisé grâce au logiciel Starview II.

III - RESULTATS

A - Sperme frais

1 - Animal 1 :

36 prélèvements de sperme ont été analysés : le volume de l'éjaculat varie entre 15 ml et 90 ml (moyenne de 37,64 ml), la mobilité moyenne est de 82 %, la motilité est bonne, la concentration moyenne est de $438,14 \cdot 10^6$ spermatozoïdes et la vitalité de 72,76 % (coloration éosine nigrosine) (Tableau 1).

Le pourcentage de vivant (vitalité) est de 72,76% (coloration éosine nigrosine) (Tableau 1).

2 - Animal 2 :

15 prélèvements ont montré que le volume de l'éjaculat est plus faible que pour l'animal 1 : 15 à 30 ml avec une moyenne de 20,2 ml, la mobilité moyenne est de 78%, la motilité est aussi bonne, la concentration moyenne est de $466,28 \cdot 10^6$ spermatozoïdes avec une vitalité de 73,46% (Tableau 1).

B - Sperme congelé

1 - Avec centrifugation

La meilleure mobilité est obtenue avec une concentration de 4% de glycérol. Le jaune d'oeuf de caille donne de meilleurs résultats que celui de poule (Tableau 2). L'analyse de variance montre qu'il n'y a pas de différences significatives entre le facteur concentration de glycérol ni le facteur milieu au risque de 5%.

2 - Sans centrifugation

La mobilité est plus élevée que celle observée dans les lots centrifugés. La linéarité est meilleure ainsi que les trajectoires (Tableau 3).

Tableau 1 : comparaison des paramètres moyens du sperme frais des baudets 1 et 2

Animal	nombre de prélèvements	volume (ml)	mobilité %	motilité (oeil)	concentration (10^6 spz / ml)	vitalité %	pH
1	36	37,64	82,36	bonne	438,14	72,76	7,35
2	15	20,2	78	bonne	466,28	73,46	7,63

Tableau 2 : variation de la mobilité des spermatozoïdes en fonction de la concentration en glycérol et de la nature du jaune d'oeuf chez les baudets 1 et 2.

	variation de la concentration en glycérol sur milieu au jaune d'oeuf de caille				variation de la concentration en glycérol sur milieu au jaune d'oeuf de poule			
	2%	3%	4%	5%	2%	3%	4%	5%
animal 1	17,21	20,57	30,64	26,14	16,57	16,21	17,36	14,93
animal 2	9,00	14,00	29,75	29,25	8,75	13,75	20,50	18,50

Tableau 3 : influence de la centrifugation sur la répartition des trajectoires des spermatozoïdes

	avec centrifugation	sans centrifugation
Nombre de trajectoires étudiés	207	280
classe 0 (en %)	13,5	22,5
classe 1 (en %)	36,7	40,5
classe 2 (en %)	0	2
classe 3 (en %)	20,8	18
classe 4 (en %)	29	17

- classe 0 : battement non caractérisé, nombre d'images exploitables insuffisant ou valeur non fiable de la fréquence de battement calculée

- classe 1 : progressifs ondulants, totalement caractérisés

- classe 2 : hyperactivés

- classe 3 : linéaires

- classe 4 : arrêts multiples et / ou prolongés.

IV - DISCUSSION

Dans cette partie, nous discutons les trois paramètres utilisés dans notre étude à savoir le jaune d'oeuf de caille, le glycérol et la centrifugation et nous déduisons les intérêts pratiques et économiques de cette étude.

A - Le jaune d'oeuf de caille

Le jaune d'oeuf de caille nous a donné de meilleurs résultats que le jaune d'oeuf de poule. Il semblerait que ce dernier contienne des lécithines qui seraient absentes dans le jaune d'oeuf de caille.

Le plasma séminal contient une lécithinase, sécrétée par les glandes de Cowper et qui hydrolyse la lécithine en acides gras et lysolécithines. Cette lysolécithine est toxique pour les spermatozoïdes (IRITANI et NISHIKAWA, 1964).

B - Le glycérol

Une concentration de 4% de glycérol donne des meilleurs résultats que les autres concentrations chez le Baudet du Poitou alors que la meilleure concentration chez le cheval est de 2,5% (PALMER, 1984).

L'augmentation du taux de glycérol dans le milieu de congélation est toxique. En effet, celui-ci se fixe au niveau de la pièce intermédiaire (centre énergétique du spermatozoïde) et modifie la perméabilité membranaire en particulier les échanges de calcium qui joue un grand rôle dans la mobilité.

C - La centrifugation

La centrifugation n'améliore pas la qualité de la semence décongelée chez le Baudet du Poitou, contrairement à ce que l'on observe chez certains chevaux.

D - Intérêts pratiques et économiques

L'élimination de la centrifugation permet de simplifier le protocole de congélation et de préserver l'intégrité des spermatozoïdes tout en évitant le recours à des matériels onéreux.

La détermination d'une méthode fiable de congélation de la semence du Baudet nous permet de réaliser une banque de sperme évitant une perte du patrimoine génétique de cette population en voie de disparition.

V - CONCLUSION

La congélation du sperme du Baudet du Poitou présente quelques particularités par rapport à celle de l'étalon : le glycérol doit être utilisé à la concentration de 4%, le jaune d'oeuf de caille est préférable au jaune d'oeuf de poule. La centrifugation n'est pas indispensable et semble plutôt nocive.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- AMANN R.P. and PICKETT. B.W. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. *Equine Veterinary Science*, 1987, 7, 3, 145--173.
- BAUMGARTI C., BADER H., DROMMER W. and LUNING. I. Ultrastructural alterations of stallion spermatozoa due to semen consevation. 9 th Inter. Congr. Anim. Reprod. AI, 5, 134-137, 1980.

BENNET J. P. and DOTT H. M. An effect of bovine seminal plasma on the impedance change frequency of epididymal spermatozoa collected from the living bull. *J. Reprod. Fert.* 1966,12, 327-336.

BERNDTSON W. E. and FOOTER. H. Bovine sperm cell volume at various intervals after addition of glycerol at 5°C. *Cryobiology*, 1972, 9, 29-33.

BIELANSKI W. The evaluation of stallion semen in aspects of fertility control and its use for artificial insemination. *J. Reprod. Fert. suppl*, 1975, 23,19-24.

CHEMINEAU P. Recherche de l'origine de l'effet dépressif du plasma séminal sur l'aptitude des spermatozoïdes de bouc à supporter la congélation. D. E. A. Uni. P. et M. Curie, Paris VI, 1978 .

BLANC G. Etude analytique de la cryopréservation du spermatozoïde équin. Mémoire Prod. Animales. E.N.I.T.A.D. 1988.

COCHRAN J. D., AMANN R. P., FROMAN D. P. and PICKETT B. W. Effects of centrifugation, glycérol level, cooling to 5°C, freezing rate and thawing rate on the post-thaw motility of equine sperm. *Theriogenology*, 1984, 22, 25-38.

CORTEEL J. M. Effets du plasma séminal sur la survie et la fertilité des spermatozoïdes conservés in vitro. *Reprod. Nutr. Dévelop*, 1980, 20, (4A), 1111-1123.

DEMICK D. S., VOSS J. L. and PICKETT B. W. Effect of cooling, storage, glycerolisation and spermatozoal numbers on equine fertility. *J. Anim Sci*, 1976, 43, 633-637.

DERIVAUX J. et ECTORS F. Reproduction chez les animaux domestiques, 3ème édition Louvain, La Neuve, Derouaux, 1986.

DOTT H. M. The effects of bovine seminal plasma on the impedance change frequency and glycolysis of bovine epididymal spermatozoa. *J. Reprod. Fert.* 1974, 38, 147-156.

DOTT H. M., HARRISON R. A. P., FOSTER G. C. A. The maintenance of motility and the surface properties of epididymal spermatozoa from bull, rabbit and ram in homologous seminal and epididymal plasma. *J. Reprod. Fert.*, 1979, 55,113-124.

DOWSETT K. F. and PATTIE W. A. Characteristics and fertility of stallion semen. *J. Reprod. Fert., Suppl.*, 1982, 32,1-8.

FAHY G. M. The relevance of cryoprotectant toxicity to cryobiology. *Cryobiology*, 1986, 23, 1-13.

GARBERS D. L., FIRST N. L., GORMAN S. K. and LARDY H. A. Effects of cyclic nucleotide phosphodiesterase inhibitors on ejaculated porcine spermatozoan metabolism. *Biol. Repro.* 1973, 8, 599-606.

IRITANI A., NISHIKAWA Y. Studies on the egg-yolk coagulating enzyme in goat semen. VI. On the chemical properties of the ejaculated semen and the secretion of accessory sexual organs in the goat. *Goat. Jap. J. Anim. Reprod.* 1964,10, 44-51.

JUSSIAUX M., TRILLAUD C., PALMER E. and LANGLOIS B. Biologie et physiologie du Cheval, 1978, 2ème édition, CEREOPA.

LAUNY F. Etude de la conservation de la semence de Baudet du Poitou. Thèse Doct.Vét. ENVN, 1990.

LINDEMANN C. B. ACAMP induced increase in the motility of demembrated bull sperm models. *Cell*, 1978,13, 9-18.

- MAGISTRINI M., CHANTELOUBE PH. and PALMER E.** Influence of season, frequency of ejaculation on stallion sperm production in freezing. *J. Reprod. Fert.* 1984, 35, 127-133.
- MANN T.** Biochemistry of stallion semen. *J. Reprod. Fert., Suppl.*, 1975, 23, 47-52.
- MANN T. and LUTWAK-MANN C.** Male reproductive function and semen, themes and trends in physiology, biochemistry and investigate andrology. Edited by Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New Work, 1981.
- MANN T., LEONE E. and POLGE C.** The composition of stallion semen. *J. Endocrin.*, 1956, 13, 279-290.
- MARTIN JC, KLUG E. and GUNZEL A.R.** Centrifugation of stallion semen and its storage in large volume straws. *J. Reprod. Fertil., Suppl.* 1979, 27, 47-51.
- MASSIP A.** Développement, ultrastructure et cryoconservation de l'oeuf de mammifère. Thèse d'agrégation, Université de Liège, 1986.
- MAZUR P.** Freezing of living cells : mechanisms and implications. *Am J. Physiol.* 1984, 247, 125-142.
- MAZUR P.** Freezing of living cells. Proc. 1st Inter. Conf. Deep Freezing Boar Semen. Edition LA Johnson and K. Larsson. 1985, 91-111.
- MAZUR P., LEIBO S. P., FARRANT J., CHU E. J. Y., HANNA M. G. and SMITH L. J.** Interactions of cooling rate, warming rate and protective additive on the survival of frozen mammalian cells. In : the Frozen Cell, London, 1970, 69-88.
- MERYMAN H. T.** Modified model for the mechanism of freezing injury in erythrocytes. *Nature*, 1968, 218, 333-336.
- NAGASE H., SOEJIMA S., NIWA T., OSHIDA H., SAGARA Y. and HOSHI S.** Studies on the freezing storage of stallion semen, I. *Jap. J. Anim. Reprod.*, 1966,12, 48-51.
- NICOLICH C.** Insémination artificielle équine. Thèse Doct. Vét. ENVN, 1989.
- NISHIKAWA Y. and SHINOMIYA S.** Our experimental results and methods of deep freezing of horse spermatozoa. *Animal Reproduction and Artificial Insemination.* 1972, 207-213.
- PALMER E.** 10ème Congrès Intern. An Reprod. An. A. I; Juin, 10-14-1984. Champaign. II.
- PALMER E., DOMERG D., FAUQUENOT A.** L'insémination artificielle des juments : bilan de cinq années de recherche et d'utilisation pratique. Le Cheval : reproduction, sélection, alimentation, exploitation. INRA 1984,133-139.
- PALMER E. et FAUQUENOT A.** Mesure et prédiction de la fertilité des étalons. *Bulletin des GTV*, 1985, 21,1, 51-63.
- PICARD L.** Principes de cryobiologie et congélation d'embryons. *Méd. Vét. Québec.* 1984, 14, 2, 55-59.
- PICKETT B. W., VOSS J. L.:** The effect of semen extenders and sperm number on mare fertility. *J. Repr. Fert., Suppl.*, 1975, 23, 95-98.
- QUINN P. J.** The fluidity of cell membranes and its regulation. *Prog. Biophys. Molec. Biol.* 1981, 38,1-104.

RALL W. F., CZLONKOWSKA M., BARTON S. C., ET POLGE C. Cryoprotection of day 4 mouse embryos by methanol. *J. Reprod. Fert.*, 1984, 70, 293-300.

RUDOLPH A. S., CROWE J. H., SPARGO B. and CROWE L. M. Interaction of cryoprotectants with lipid bilayers. *Cryobiology*, 1986, 23, 543.

SHANNON P. Presence of a heat-labile toxic protein in bovine seminal plasma. *J. Dairy Sci.* 1965, 48, 1362-1365.

SULLIVAN J. J. and PICKETT B. W. Influence of ejaculation frequency of stallions on characteristics of semen and output of spermatozoa. *J. Reprod. Fert., Suppl.* 1975, 23, 29-34.

TAMBLYN T. M., SINGH J. P., LORTON S. P. and FIRST N. L. Mechanisms controlling motility of stallion spermatozoa. *J. Reprod. Fert., Suppl.*, 1979, 27, 31-37.

THIBAUT C. La fécondation, Vol. 1, édition Masson, 1975, 1-11.

VAISSAIRE J. P. Sexualité et reproduction des mammifères domestiques et de laboratoire. Edition Maloine, Paris, 1977.

WATSON P. F. Effects of low temperatures on Biological Membranes. Edition G. J. MORRIS and a CLARKE, Academic Press, London 1981.

WERTHESEN N. T. Male sex hormone and its role in reproduction. *Rec. Prog. Hormone Res.* 1956, 12, 370.

19ème Journée d'Etude



3 Mars 1993

**UN BILAN DU PARASITISME DIGESTIF
DES CHEVAUX EN NORMANDIE**

Par : J.F. COLLOBERT,
Viviane MARIAN, Claire COLLOBERT-
LAUGIER, P. LEQUESNE, P. ROUVIERE

Direction des Services Vétérinaires du
Calvados - 6, boulevard Général Vanier -
14040 CAEN Cédex (la Pierre Heuzé)

Résumé

La prévalence des parasites digestifs a été déterminée par l'examen de 602 chevaux normands. Les espèces suivantes ont été retrouvées : *Gasterophilus* sp. (68,3 %), *Anoplocephala perfoliata* (43,7 %), petits strongles (37,2 %), grands strongles (21,4 %), *Oxyuris equi* (0,7 %), *Parascaris equorum* (0,5 %). Une endartérite vermineuse (*Str. vulgaris*) affectait 8,3 % des chevaux. Au total, 85,9 % des chevaux étaient parasités : 28,6 % par une seule famille de parasites ; 57,3 % par deux ou plus.

MOTS CLES : CHEVAL, PARASITISME, DIGESTIF, PREVALENCE, NORMANDIE

Summary

A post-mortem study of 602 horses from Normandy was done to determine the prevalence of digestive parasites. The following species were found : *Gasterophilus* sp. (68,3 %), *Anoplocephala perfoliata* (43,7 %), small strongyles (37,2 %), large strongyles (21,4 %), *Oxyuris equi* (0,7 %), *Parascaris equorum* (0,5 %). 8,3 % of horses showed verminous aneurysm. The prevalence of parasitism in the 602 horses was 85,9 %. Only one family of parasites was recovered from the digestive tract of 28,6 % of horses and two or more from 57,3%.

KEY-WORDS : HORSE, PARASITES, DIGESTIVE, PREVALENCE, NORMANDY