



EVALUATION DE LA QUALITE DES SPERMATOZOÏDES D'ÉTALONS PUR SANG ARABE CONGELES DANS LE MILIEU INRA 96[®] SUPPLEMENTE DE JAUNE D'ŒUF ET DE GLYCEROL

Par :

- A. Najjar ¹, J.M. Yvon ², B. Benaoun ³, M. Ezzaouia ³, E. Pillet ²,
F. Batellier ², M. Ben M'rad ¹, M. Magistrini ²
- ¹ Institut National Agronomique de Tunisie ;
- ² INRA UMR 85 Physiologie de la Reproduction et des
Comportements, 37 380 Nouzilly, France ;
- ³ Haras National de Sidi Thabet, FNARC, Tunisie
- amelnajarbenmatoug@yahoo.fr

Résumé

Dans le cadre du développement de l'insémination artificielle chez les chevaux Pur Sang Arabe en Tunisie, la semence de 4 étalons (2 étalons de 13 ans et 2 étalons de 23 ans) a été congelée dans le milieu INRA96[®] supplémenté de 2% de jaune d'œuf et de 2.5% de glycérol. Après décongélation, des analyses *in vitro* portant sur la mobilité, l'intégrité de la membrane plasmique, la viabilité et l'intégrité de l'acrosome ont été réalisées. Le pourcentage de spermatozoïdes rapides et progressifs ainsi que la viabilité ont été significativement plus élevés pour 3 des 4 étalons. Les pourcentages de spermatozoïdes présentant une membrane plasmique et un acrosome intacts ont été significativement supérieurs chez les étalons les plus jeunes comparés aux étalons âgés. Cette étude sur l'aptitude à la congélation de la semence d'étalon pur sang arabe est la première réalisée en Tunisie. L'analyse des paramètres *in vitro* montre que la semence congelée dans le milieu INRA96[®] supplémenté de jaune d'œuf et de glycérol, est de bonne qualité pour 3 des 4 étalons. Une étude *in vivo* est indispensable pour confirmer ces premiers résultats.

Mots-clés : semence, pur sang Arabe, congélation, paramètres *in vitro*, milieu INRA 96[®]

Summary

With the aim of developing the artificial insemination in Tunisia, semen from 4 Arabian stallion was frozen in INRA 96[®] extender supplemented with 2% egg yolk and 2,5% glycerol. After thawing, *in vitro* analyses interesting mobility, viability, plasma membrane and acrosomal integrity were realized. The percentages of rapid, progressive and viable sperm cells were significantly higher for 3 stallions. Besides, the percentage of sperm cells with intact plasma membrane and acrosome were greater in the younger stallions contrary to the older ones. Our study on freezing ability of semen from Arabian stallions is the first one realized in Tunisia. *In vitro* parameters show that, for 3 stallions, semen frozen in INRA96[®] extender supplemented with egg yolk and glycerol can be considered having a good sperm quality. A fertility trial is needed to confirm these first results.

Key-words: semen, Arabian stallions, freezing, *in vitro* parameters, INRA96[®] extender

Introduction

La congélation de la semence est actuellement la méthode la plus efficace pour conserver et diffuser le patrimoine génétique. Aussi, en Tunisie, dans le cadre du développement du programme d'insémination artificielle des chevaux pur sang arabe, la semence de quatre étalons a été récoltée et congelée pour la première fois dans le milieu INRA 96® supplémenté de jaune d'œuf et de glycérol. Cependant, l'aptitude à la congélation mesurée par des paramètres *in vitro* ou bien par la fertilité, a toujours connu des variations individuelles considérables. Une étude finlandaise a montré que seulement 20 % des étalons fertiles produisent de la semence de qualité satisfaisante après congélation – décongélation (Katila, 2001). En France, dans les Haras Nationaux, environ 80% des étalons candidats ont une semence dont l'aptitude à la congélation est jugée satisfaisante, c'est-à-dire que plus de 30% des éjaculats congelés présentent une mobilité supérieure ou égale au seuil de sélection (Vidament, 2005).

Afin d'évaluer la qualité de la semence des étalons pur sang arabe tunisien, des analyses *in vitro* ont été réalisées sur un échantillon de paillettes afin de juger la qualité des spermatozoïdes de ces étalons et par conséquent, leur utilisation potentielle en insémination artificielle.

1. Matériel et méthodes

La semence de deux étalons âgés de 13 ans et de deux âgés de 23 ans de race pur sang arabe a été collectée et congelée dans le Haras National de Sidi Thabet en Tunisie, et ceci durant la période s'étalant du mois de décembre 2007 jusqu'au début février 2008. Le nombre d'éjaculats par étalon a varié de 4 à 10. La congélation a été réalisée selon le protocole décrit par le guide d'insémination artificielle publié par les Haras Nationaux (2004). La décongélation et l'analyse *in vitro* de la qualité de la semence ont été réalisées à l'INRA de Nouzilly en France. Pour cela 2 paillettes par éjaculat et par étalon ont été analysées pour les paramètres de mobilité, l'intégrité de la membrane plasmique, la viabilité et l'état de l'acrosome des spermatozoïdes.

L'analyse de la mobilité des spermatozoïdes a été réalisée à l'aide d'un analyseur automatisé de mobilité assisté par ordinateur (IVOS, version 10, Hamilton Thorne, Beverly, MA, USA). Le pourcentage de spermatozoïdes progressifs (PROG) et le pourcentage de spermatozoïdes rapides (RAP) ont été déterminés.

L'intégrité de la membrane plasmique des spermatozoïdes a été évaluée en appliquant le protocole du test HOS décrit par Jeyendran et Van Der Ven (1992). Les spermatozoïdes dont l'intégrité de la membrane est intacte présentent un gonflement caractéristique marqué par l'enroulement du flagelle (HOS+).

L'évaluation de la viabilité des spermatozoïdes a été effectuée grâce à un marquage des spermatozoïdes avec le kit de viabilité composé des 2 sondes fluorescentes le SYBR-14 et l'Iodure de Propidium (IP), selon la méthode décrite par Garner *et al.* (1994). Les spermatozoïdes vivants émettent une fluorescence verte (SYBR-14), alors que les spermatozoïdes morts émettent une fluorescence rouge (IP).

L'état de l'acrosome a été évalué grâce au marquage des spermatozoïdes avec une lectine, la PSA (Pisum Sativum Agglutinin) couplée au FITC qui est un marqueur fluorescent selon la méthode décrite par Guitton *et al.* (2001) et adaptée par Meyers *et al.* (1995). Cette coloration permet d'identifier 2 grandes catégories de spermatozoïdes : ceux dont l'acrosome est intact présentent une fluorescence verte uniforme sur la région acrosomique, et ceux dont l'acrosome est endommagé présentent soit une fluorescence au niveau du segment équatorial, soit une absence de fluorescence totale au niveau de la tête du spermatozoïde.

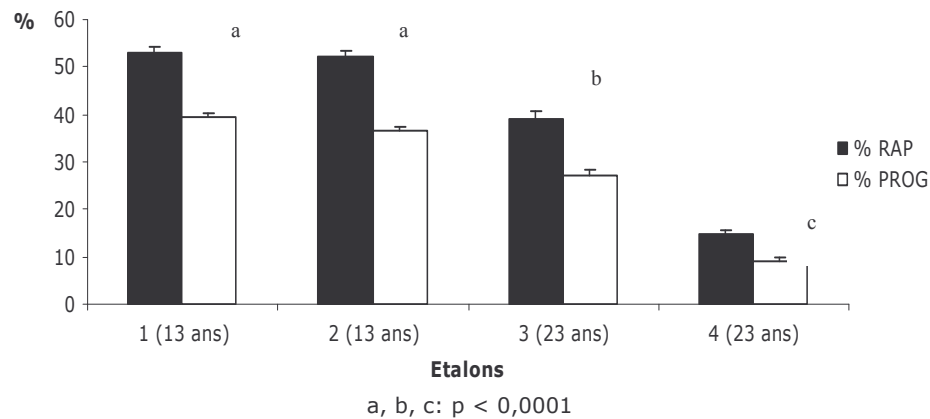
Pour l'analyse statistique, les paramètres de mobilité, les variables de l'état de l'acrosome, le pourcentage de spermatozoïdes gonflés ainsi que le pourcentage de spermatozoïdes vivants ont été soumis à une analyse de variance en utilisant la procédure GLM du logiciel SAS. Des covariances ont été déterminées à partir des

mesures répétées. Les effets des facteurs de variation étalon, éjaculat et paillette ont été considérés. Les différences entre variables ont été considérées comme significatives pour $p < 0,05$.

2. Résultats

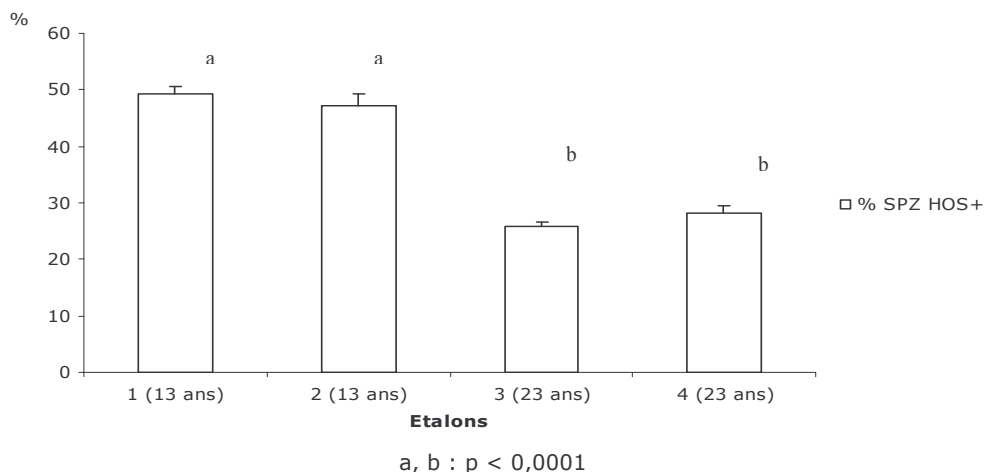
Concernant les paramètres de mobilité des spermatozoïdes (Figure I), les valeurs moyennes du pourcentage de spermatozoïdes rapides et de spermatozoïdes progressifs ont été significativement plus élevées chez les étalons les plus jeunes (1 et 2) que chez les étalons âgés (3 et 4) ($p < 0,0001$). Cependant, ces deux paramètres ont été significativement plus élevés ($p < 0,0001$) chez l'étalon 3 que chez l'étalon 4. L'effet du facteur éjaculat a été significatif ($p < 0,0001$).

Figure I : Pourcentage des spermatozoïdes rapides (%RAP) et pourcentage des spermatozoïdes progressifs (%PROG) (analyse automatisée) après décongélation.
(étalon 1 : 10 éjaculats ; étalons 2 : 9 éjaculats ; étalon 3 : 5 éjaculats ; étalon 4 : 4 éjaculats)
Figure I: Percentage of rapid sperm cells (%RAP) and progressive sperm cells (%PROG) (CASA) after thawing
(stallion 1: 10 ejaculate; stallion 2: 9 ejaculate; stallion 3: 5 ejaculate; stallion 4: 4 ejaculate)



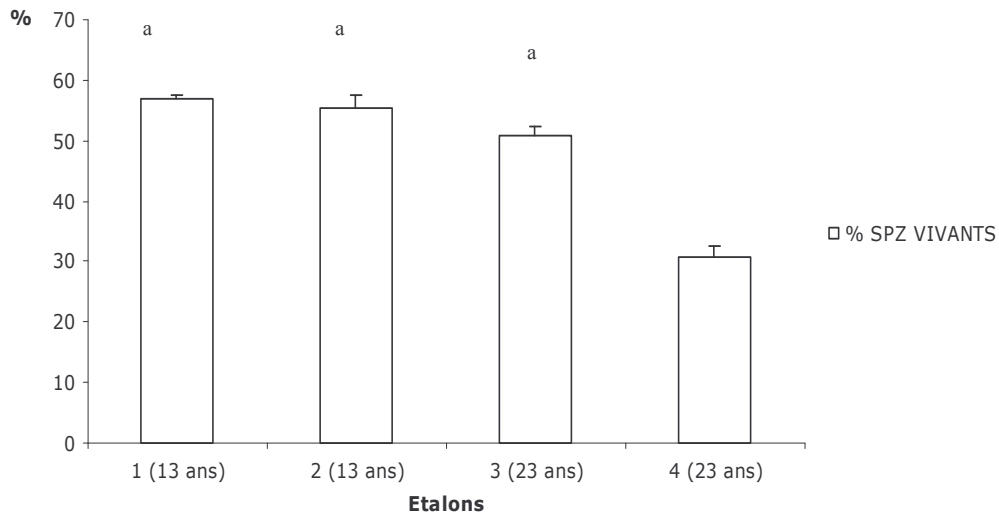
L'évaluation de l'intégrité de la membrane plasmique (Figure II) a montré que le pourcentage de spermatozoïdes HOS+ a été significativement plus élevé ($p < 0,0001$) chez les étalons jeunes (49,3 % et 47,3 %) comparé aux étalons âgés (25,7 % et 28,1 %). Le facteur éjaculat s'est révélé significatif ($p < 0,01$).

Figure II : Intégrité de la membrane plasmique des spermatozoïdes après décongélation évaluée par le test hypoosmotique (% SPZ HOS+ : pourcentage de spermatozoïdes présentant un gonflement caractéristique marqué par l'enroulement du flagelle)
(étalon 1 : 10 éjaculats ; étalons 2 : 9 éjaculats ; étalon 3 : 5 éjaculats ; étalon 4 : 4 éjaculats)
Figure II: Sperm cells membrane integrity after thawing evaluated by the hypoosmotic swelling test (HOS test) (% SPZ HOS+ : Percent swelling sperm cells)
(stallion 1: 10 ejaculate; stallion 2: 9 ejaculate; stallion 3: 5 ejaculate; stallion 4: 4 ejaculate)



Le pourcentage de spermatozoïdes vivants (Figure III) a été significativement ($p < 0,0001$) plus élevé chez les étalons 1, 2 et 3 (56,8 %, 55,3 % et 50,9 %) que chez l'étalon 4 (30,8 %). A nouveau, le facteur éjaculat a été significatif ($p < 0,05$).

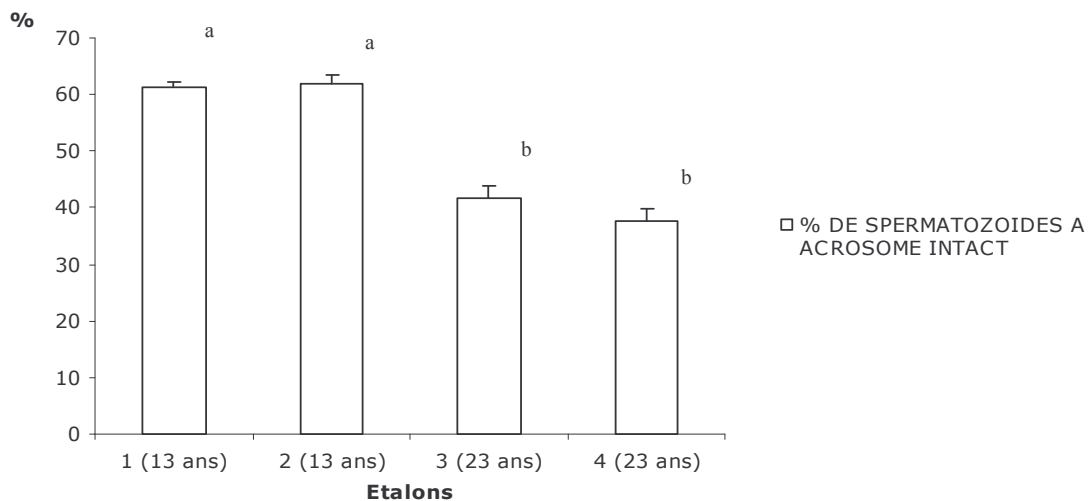
Figure III : Viabilité des spermatozoïdes après décongélation
(étalon 1 : 10 éjaculats ; étalons 2 : 9 éjaculats ; étalon 3 : 5 éjaculats ; étalon 4 : 4 éjaculats)
Figure III: Sperm cells viability after thawing
(stallion 1: 10 ejaculate; stallion 2: 9 ejaculate; stallion 3: 5 ejaculate; stallion 4: 4 ejaculate)



a, b : $p < 0,0001$

Pour l'évaluation de l'état de l'acrosome (Figure IV), le pourcentage de spermatozoïdes possédant un acrosome intact a été significativement plus élevé ($p < 0,0001$) chez les étalons jeunes (61,4 % et 61,9 %) que chez les étalons âgés (41,7 % et 37,8 %). Les résultats de l'analyse statistique ont montré que le facteur éjaculat a aussi été significatif ($p < 0,001$).

Figure IV : Pourcentage des spermatozoïdes possédant un acrosome intact évalué par la sonde fluorescente PSA-FITC.
(étalon 1 : 10 éjaculats ; étalons 2 : 9 éjaculats ; étalon 3 : 5 éjaculats ; étalon 4 : 4 éjaculats)
Figure IV: Percentage of sperm cells with intact acrosome analyzed by FITC-PSA fluorescent probe
(stallion 1: 10 ejaculate; stallion 2: 9 ejaculate; stallion 3: 5 ejaculate; stallion 4: 4 ejaculate)



a, b : $p < 0,0001$

3. Discussion

Les résultats de notre étude ont montré que le pourcentage de spermatozoïdes rapides qui est le paramètre de mobilité déterminant pour la sélection des éjaculats lors de l'insémination artificielle de semence congelée a été supérieur à 35 % chez les étalons 1, 2 et 3. De plus le pourcentage de spermatozoïdes vivants a été supérieur à 50 % chez ces mêmes étalons, sachant qu'il a été rapporté qu'il existe une corrélation élevée ($r = 0,98$) entre la mobilité et la viabilité (Love et al., 2003). Tenant compte de ces deux paramètres, la qualité des spermatozoïdes des étalons 1, 2 et 3 congelés dans le milieu INRA96® additionné de jaune d'œuf et de glycérol a été acceptable. Par ailleurs, l'intégrité de la membrane plasmique et de l'acrosome des spermatozoïdes qui sont des facteurs déterminant dans la fécondation, a été mieux préservée chez les étalons jeunes que chez les étalons âgés. Ces résultats posent la question de la relation entre paramètres *in vitro* et fertilité mais aussi de la dégradation de la qualité des spermatozoïdes avec l'âge des étalons. En effet, les paramètres de mobilité et la viabilité des spermatozoïdes de l'étalon âgé 3 sont du même ordre que ceux des étalons jeunes 1 et 2 alors que les taux de membrane plasmique et d'acrosome intacts sont significativement plus bas. Un tel étalon peut-il malgré tout être utilisé en insémination artificielle à partir de semence congelée ? Les résultats obtenus dans le laboratoire (Pillet et al., 2008), dans une étude comparative entre deux milieux de congélation dont l'INRA96® additionné de jaune d'œuf et de glycérol, ont montré que les variations observées lors de l'analyse *in vitro* des spermatozoïdes ne reflétaient pas celles observées *in vivo*. De plus, Kuisma et al. (2006) ont rapporté que les méthodes de laboratoire courantes ne peuvent pas estimer la fertilité réelle des spermatozoïdes après congélation-décongélation.

En conclusion, cette étude sur l'aptitude à la congélation de la semence d'étalon pur sang arabe est la première réalisée en Tunisie. L'analyse des paramètres *in vitro* montre que la semence congelée dans le milieu INRA96® supplémenté de jaune d'œuf et de glycérol, est de bonne qualité pour 3 des 4 étalons. Une étude *in vivo* est indispensable pour confirmer ces premiers résultats en particulier pour l'étalon 3.

Remerciements

Nous remercions le personnel du Haras National de Sidi Thabet pour son aide au cours de la congélation de la semence des étalons. Nous remercions aussi l'équipe de l'unité expérimentale équine de Nouzilly pour sa collaboration au cours de l'analyse *in vitro*.

Bibliographie

Insémination artificielle équine. Guide pratique. 3ème édition, 2004, édité par Les Haras Nationaux, Direction des connaissances, ENPH, 61310 Le Pin au Haras. Site web: <http://www.haras-nationaux.fr>.

GARNER DL, JOHNSON LA, YUE ST, ROTH B AND HAUGDAND RP, Dual DNA staining assesment of bovine sperm viability using SYBR-14 and propidium iodide. J. Androl., 15 (1994), p.620-629.

GUITTON E., LE VERN Y., KERBOEUF D., MAGISTRINI M., Flow cytometric evaluation of acrosomal status in equine spermatozoa using FITC-Pisum Sativum Agglutinin. Anim. Reprod. Sci.,68, 3-4 (2001), p.360-361.

JEYENDRAN R.S., VAN DER VEN H.H., The hypoosmotic swelling test : an update. *Arch. Androl.*, 29 (1992), p.105-116.

KATILA T., *In vitro* evaluation of frozen-thawed stallion semen: A Review. *Acta Vet. Scand.*, 42 (2001), p.199-217.

KUISMA P., ANDERSSON M., KOSKINEN E., KATILA T., Fertility of frozen – thawed stallion cannot be predicted by the currently used laboratory methods, *Acta vet. Scand.*, 48, 14 (2006), p.1-8.

LOVE C.C., THOMPSON J.A., BRINSKO S.P., RIGBY S.L., BLANCHARD T.L., LOWRY V.K., VARNER D.D., Relationship between stallion motility and viability as detected by two fluorescence staining techniques using flow cytometry, *Theriogenology*, 60 (2003), p.1127-1138.

MEYERS S.A., OVERSTREET J.W., LIU I.K.M., DROBNIS E.Z., Capacitation *in vitro* of stallion spermatozoa: comparison of progesterone-induced acrosome reactions in fertile and subfertile males. *J. Androl.*, 16 (1995), p.47-54.

PILLET E., BATELLIER F., DUCHAMP G., FRURSTOSS V., BRUNEAU B., YVON J.M., LE VERN Y., KERBOEUF D., VIDAMENT M., MAGISTRINI M., Le milieu l'INRA® 96 supplémenté de jaune d'œuf et de glycérol améliore la fertilité en insémination artificielle de la semence congelée, *Compte rendu général de la 34^{ème} journée de la Recherche Equine* (2008), p.39-48.

VIDAMENT M., French field results (1985-2005) on factors affecting fertility of frozen stallion semen. *Anim. Reprod. Sci.*, 89, 1-4 (2005), p.115-134.