

8 Mars 1989



1520

 ETUDE ANALYTIQUE DE LA CRYOPRESERVATION

 DU SPERMATOZOÏDE EQUIN

Par G. BLANC, M. MAGISTRINI,
 P. NOUE, E. PALMER
 INRA - Station de Physiologie
 de la Reproduction
 37380 MONNAIE

Résumé

Nous avons réalisé une analyse du comportement du spermatozoïde équin au cours du protocole INRA 82 de congélation. L'expérience a porté sur un lot de 4 chevaux x 3 éjaculats. L'étude a été faite à la fois sur les caractéristiques de mobilité (état du flagelle) et de marquage par la Succinyl Concanavoline A (Etat de la tête). Ce marqueur, couplé à une molécule fluorescente (FITC) permet une visualisation directe des modifications membranaires. Les résultats montrent une altération progressive de la membrane du spermatozoïde. Cette dégradation du spermatozoïde est surtout sensible au niveau de zones de moindre résistance (segment équatorial de la tête) ou de zones soumises à de fortes contraintes (acrosome et pièce intermédiaire). Nous avons pu remarquer des corrélations hautement significatives entre les variables de mobilité (mobilité, vitesse) et des marquages correspondant à un faible état d'altération de la tête. Ceci, a posteriori, prouve la validité du critère de choix des éjaculats à la décongélation. Enfin, nous avons pu remarquer qu'un enrobage des spermatozoïdes par la succinyl Con A permet d'améliorer l'état de l'acrosome durant les 3 phases : - descente de température, - addition de glycérol et - congélation-décongélation.

Mots-Clés : ETALON, SPERMATOZOÏDE, CONGELABILITE, CONCANAVALINE A MEMBRANES.

Summary

We have done an analytical study of equine spermatozoa behavior during an experiment of INRA 82's freezing procedure. We have used 4 stallions and 3 ejaculates per stallion. Experimentation have been carried out on mobility parameters (flagellum state) and, at the same time, on Succinyl Concanavalin A staining parameters (head of the spermatozoon state). Succinyl Con A, coupled with a fluorescent molecule (FITC), allow a direct visualization of plasma membranes modifications. Results have shown a progressive alteration of spermatozoon plasma membranes. This degradation was more effective on the less resistant zones (equatorial segment of the head) or very requested areas (acrosomal region and midpiece). They were highly significant correlations between mobility parameters (mobility, path speed, lateral head displacement) and stainings corresponding to the low head alteration state. This, a posteriori, justify the use of mobility as a criteria of testing viability of sperm after thawing. Finally, we have observed that a coating of spermatozoa, by Succinyl Con A improved acrosomal state during the 3 stages of freezing procedure : - Decrease of temperature, - Glycerol addition and, - Freezing-thawing.

Key-Words : STALLION, SPERMATOZOA, FREEZABILITY, CONCANAVALINE A, PLASMA MEMBRANES.

1520

INTRODUCTION

La congélation du sperme équin est une technique aujourd'hui éprouvée. Les résultats de fertilité sont encore légèrement plus faibles que ceux en monte naturelle (35 % vs 45 % pour la fertilité / cycle). Une bonne gestion du troupeau femelle (échographie, induction d'ovulation, etc...) permet d'atteindre de tels résultats.

Les principaux problèmes posés par la congélation de sperme équin sont les suivants :

- Des résultats en congélation soumis à une très forte variabilité inter-étalons et même inter-éjaculats.
- Une méthode d'analyse du sperme fondée sur la seule mobilité à la décongélation qui ne prend pas en compte la morphologie de la tête.

Nous avons voulu, au travers de ces expérimentations, décrire les modifications membranaires induites par les différentes phases du protocole INRA de congélation (PALMER, 1984), et isoler les effets des différents facteurs.

Notre second objectif était de protéger "mécaniquement" les membranes de la tête spermatique par un enrobage à l'aide d'une molécule se fixant sur certains résidus sucrés.

Ce double objectif a pu être mené à bien par l'utilisation de la Concanavalline A stabilisée sous sa forme dimérique (Con A 2).

De plus, l'unique méthode aujourd'hui utilisée pour estimer la qualité d'un sperme à la décongélation est l'analyse de sa mobilité. Il nous a donc paru intéressant de rechercher les corrélations que nous pouvions avoir entre morphologie et mobilité.

1) MATERIEL ET METHODES

Le principe de l'expérimentation était de réaliser à chacune des étapes du protocole de congélation un marquage des membranes et une analyse des paramètres de mobilité des spermatozoïdes. Le marquage à la Con A 2 a pour but de renseigner sur l'état de la tête (marquage préférentiel à ce niveau) et l'analyse de la mobilité sur celui du flagelle.

1) Protocole de congélation :

Rappelons les différentes étapes du protocole INRA 82 :

a) Dilueurs utilisés :

La congélation du spermatozoïde d'étalon passe par une nécessaire dilution du sperme afin de limiter l'effet nocif du plasma séminal (PALMER et al., 1984). Il est ensuite nécessaire de protéger les spermatozoïdes des altérations liées la cristallisation de l'eau intra et extracellulaire en introduisant du glycérol dans le milieu (effet "antigel").

Nous avons utilisé les dilueurs INRA de congélation. Cependant, pour des raisons de visibilité lors des examens de morphologie, ils ont été centrifugés 15 mn à 3000 g.

b) Protocole de congélation :

Nous allons rappeler simplement le déroulement de ce dernier :

* Congélation :

- Récolte et dilution de la semence à 35°C.
- 1ère descente de température : De 35 °C à 4 °C pendant 1h dans le premier dilueur.
- 2nde descente de température : De +4 °C à -140 °C pendant 10 mn, dans le dilueur glycérolé.
- Conservation dans l'azote liquide.

* Décongélation :

- A 37 °C pendant 30 s.

* Observation :

- Après dilution dans un milieu sans jaune d'oeuf, ni glycérol et incubation 10 mn à 37°C

2) Marquage des membranes et observations :

La molécule utilisée appartient à la famille des lectines, protéines extraites principalement des végétaux. Elles ont la propriété de se fixer sur certains résidus glycosidiques. La Concanavalline A (Con A) possède un très large spectre de fixation et, pour cette raison, a été largement utilisée dans les études menées sur la tête du spermatozoïde. Nous avons choisi d'utiliser, conformément aux résultats de l'étude bibliographique (KOEHLER, 1980; CROSS et OVERSTREET, 1987; GOLSDTEIN et PORETZ, 1986), la Con A stabilisée sous sa forme dimérique : Succinyl Con A (Con A 2).

Des expérimentations préalables ont permis de définir la technique de marquage. Au sperme dilué était ajouté la solution de Con A 2 (1mM) dans le rapport (2V pour 3V).

La lecture des lames était réalisée, à l'aide d'un microscope à fluorescence, sur frottis lutés.

Un certain nombre d'images caractéristiques des différents aspects des spermatozoïdes ont été répertoriées. Leur répartition a été analysée par comptage sur au moins 150 spz/lame (2 lames de chaque échantillon étaient observées).

Les marquages et les lectures ont été réalisés à différents moments durant le protocole de congélation amenant à 7 types d'échantillons (Cf Tableau 1). Ils donnent une photographie à l'instant t, mais aussi permettent d'estimer l'effet de la présence de Con A 2 au cours de certaines étapes.

3) Analyse de la mobilité :

Nous avons utilisé un analyseur de mobilité : Hamilton Thorn Research Motility Analyser (HTM 2000). Cet appareil possède une caméra couplée à un ordinateur qui digitalise les images, analyse les trajectoires par comparaison d'images successives et calcule les différents paramètres de mobilité. Cette analyse a été réalisée en parallèle à la préparation des lames sur les mêmes échantillons marqués (Cf Tableau 1).

4) Analyses statistiques :

Nous avons tout d'abord réalisé un certain nombre d'études statistiques (analyse de variance) afin d'extraire de ces 2 groupes de paramètres (morphologie et mobilité) ceux pour lesquels le type d'échantillon avait un effet significatif (Cf Tableau 2).

Nous ne traiterons dans la suite de cet exposé que des paramètres définis tableau 2.

Nous avons ensuite procédé à des tests de comparaisons de moyennes. Les pourcentages étaient transformés en Arcsinus. Les comparaisons permettant de répondre aux questions posées étaient réalisées par la méthode des contrastes.

Ces paramètres ont aussi été soumis à une analyse des corrélations afin de visualiser un lien entre variables de morphologie et variables de mobilité.

II) RESULTATS

Nous allons traiter séparément des 2 objectifs : visualisation directe des modifications à un instant t et effet possible de protection par la Con A 2 au cours d'étapes du protocole. Nous aborderons ensuite les résultats obtenus lors de l'étude des corrélations.

1) Visualisation directe des modifications : (Tableau 3)

Nous présentons ici les échantillons pour lesquels les observations étaient faites immédiatement après fixation de Con A 2 (échantillons 1(1), 2(2), 3(3) et 4(4)).

Nous avons postulé que l'état dans lequel se trouvait le spermatozoïde après dilution était son stade de moindre dégradation. Donc toute modification de cet état était considéré comme une altération.

a) Définition du spermatozoïde "normal" :

* Etat de la tête :

Ce spermatozoïde (échantillons 1(1)) est caractérisé par :

- Une membrane acrosomique lisse (72 %)
- Un segment équatorial marqué (75 %)
- Une fluorescence plus intense sur le post-acrosome que sur l'acrosome avec marquage du segment équatorial.

* Mobilité :

La vitesse moyenne est de 114 μ /s, la mobilité globale mesurée à l'HTM 2000 de 84 % et l'indice de déplacement latéral de la tête de 6.

b) Effets des différentes étapes :

* Descente de température :

Comparaison des échantillons 1(1) vs 2(2)

Elle se traduit, sur le plan morphologique, par :

- une augmentation du nombre de spermatozoïdes "altérés" (de 14 à 24 %)

- une baisse équivalente du pourcentage de cellules dont le segment équatorial est marqué (de 75 à 61 %) et des spermatozoïdes normaux (de 52 à 41 %).

Les variables de mobilité sont, quant à elles, peu affectées par cette descente de température : la vitesse moyenne est de 117 μ/s , la mobilité de 76 % et l'indice de déplacement latéral de la tête de 5.

- * Addition de glycérol :
Comparaison des échantillons 2(2) vs 3(3)

Cette étape diminue le pourcentage de spermatozoïdes normaux (de 41 à 27 %) ainsi que celui des spermatozoïdes présentant un acrosome lisse (de 71 à 57 %). Cependant, malgré une baisse équivalente du nombre de spermatozoïdes présentant un segment équatorial marqué (de 61 à 54 %), il n'y a pas de modification du pourcentage de spermatozoïdes altérés (24 %).

La vitesse moyenne est réduite (de 117 à 92 μ/s) ainsi que le déplacement latéral de la tête (de l'indice 5 à l'indice 4).

- * Congélation - Décongélation :

C'est cette étape double qui apporte le plus de modifications :

- une chute brutale de tous les paramètres définissant un spermatozoïde normal : classe "normal" (de 27 à 15 %), acrosome lisse (de 57 à 46 %), segment équatorial marqué (de 54 à 29 %)
- une chute des variables de mobilité (de 73 à 28 %), vitesse (de 92 à 71 μ/s) et déplacement latéral de la tête (de l'indice 4 à l'indice 3)
- une augmentation des spermatozoïdes altérés (de 24 à 38 %).

2) Effets de protection par la Con A 2 :

Notre deuxième objectif était de protéger les membranes par enrobage des cellules.

Les résultats, présentés dans les tableaux 4, 5 et 6, montrent que l'effet escompté est peu flagrant.

On constate un effet protecteur de la présence de Con A 2 :

- pendant l'addition de glycérol sur l'aspect lisse de l'acrosome observé avant ou après congélation ($p < 0,01$) (Cf Tableaux 4 et 5)
- pendant la congélation, sur l'aspect lisse de l'acrosome ($p < 0,01$) et sur la mobilité à la décongélation ($p < 0,05$) (Cf Tableau 6).

3) Corrélations entre variables de morphologie et de mobilité :

Du fait de l'échantillonnage, le seuil de validité à 1 % des corrélations est 0,21.

Nous pouvons voir que toutes les corrélations présentées ci-dessous sont hautement significatives. La mobilité est corrélée positivement avec l'état normal de la tête et négativement avec son altération.

Paramètres	Vitesse moyenne	Mobilité globale	Déplact. Latér de la tête
Spz Normal	+ 0,39	+ 0,39	+ 0,52
Spz Altéré	- 0,38	- 0,50	- 0,43
Acro. Lisse	+ 0,30	+ 0,40	+ 0,37
Segt éq marq	+ 0,41	+ 0,54	+ 0,49

III) DISCUSSION

L'utilisation de Con A 2 nous a permis d'observer l'apparition progressive d'altérations sur les têtes des spermatozoïdes au fur et à mesure des étapes du protocole de congélation. Par contre, elle ne met pas en évidence les altérations du flagelle. La chute de mobilité est probablement le témoin d'altérations du flagelle et de la pièce intermédiaire.

La baisse de température, dans la zone des températures positives, se traduit par une augmentation de la fluidité membranaire et une agrégation des protéines (AMANN et PICKETT, 1987). Elle augmente la perméabilité cellulaire. La perte de molécules et d'ions intracellulaires entraînent une diminution de production énergétique.

Dans notre expérimentation, nous ne constatons pas de chute de mobilité; seul le segment équatorial paraît altéré. Ceci suggère la présence, à ce niveau, d'une zone de sensibilité à la température.

L'effet du glycérol est principalement osmotique. Il apparaît cependant qu'il provoque des modifications membranaires (AMANN et PICKETT, 1987). Ces modifications peuvent être à l'origine de la diminution des caractéristiques de mobilité et des modifications de répartition du marquage.

Les lésions qui peuvent apparaître sur le spermatozoïde pendant les phases de congélation et décongélation sont de 2 ordres :

- Effets mécaniques lors de la formation de glace intra ou extracellulaire.
- Effets chimiques de toxicité du milieu par concentration des sels au cours de la déshydratation.

Aux vues de nos résultats, il est difficile de séparer ces 2 effets. Nous pouvons tout de même remarquer que les altérations graduelles observées lors des précédentes phases sont amplifiées par la congélation-décongélation.

Les lectines ont été exclusivement utilisées jusqu'alors, dans le suivi de modifications membranaires : maturation épидидymaire (FOURNIER-DELPECH et COUROT, 1980) et capacitation (SCHWARTZ et KOEHLER, 1979).

Les effets d'éventuelles protections par enrobage des spermatozoïdes n'ont jamais été mis en évidence. Nous avons pu remarquer, dans notre expérimentation, des protections :

- sur l'état lisse de l'acrosome pendant l'addition de glycérol (observé avant ou après congélation)
- sur l'état lisse de l'acrosome et sur la mobilité pendant la congélation-décongélation.

Cette amélioration si faible soit-elle peut être une hypothèse de travail à explorer.

Enfin, l'étude des corrélations entre variables de morphologie et de mobilité montre que le critère de sélection des éjaculats à la décongélation est judicieux puisque la mobilité est corrélée positivement avec un faible état d'altération de la tête du spermatozoïde.

CONCLUSION

Les résultats que nous venons d'exposer mettent l'accent sur les phases critiques de la congélation. Ainsi :

* La descente de température, sans modifier la mobilité des spermatozoïdes, entraîne une diminution du marquage du segment équatorial. Cela suggère la présence d'une zone sensible à la température à ce niveau.

* L'addition de glycérol se traduit par une diminution du nombre de spermatozoïdes présentant un aspect lisse de l'acrosome. Elle entraîne également une baisse générale de la mobilité.

* La congélation et la décongélation diminuent le pourcentage de spermatozoïdes ayant des segments équatoriaux marqués et la mobilité. L'effet principal, au cours de ces 2 phases, serait osmotique. Ainsi, les passages d'eau, plus ou moins forcés, altèrent les zones de moindre résistance : segment équatorial de la tête et pièce intermédiaire (centre moteur de la cellule).

Notre essai de protection directe de la membrane a permis d'améliorer l'état de l'acrosome. Cependant, cela n'a que peu amélioré la mobilité à la décongélation.

Sur le terrain, nous avons pu remarquer que pour des éjaculats possédant des mobilités équivalentes, d'autres paramètres tels que la vitesse pouvaient être différents. Il pourrait donc être judicieux d'introduire de nouveaux critères, de mobilité ou de morphologie, dans le choix d'éjaculats à la décongélation.

Enfin, améliorer la congélabilité du sperme c'est avant tout permettre l'utilisation de la plupart des étalons. Cela passe nécessairement par une meilleure connaissance des phénomènes intervenant sur le spermatozoïde. Cette étude nous a permis de cartographier les modifications membranaires. Il faudrait maintenant coupler ces résultats avec des tests de fertilité et étudier dans quelles mesures ils diffèrent d'un étalon à l'autre.

Remerciements :

Nous tenons à remercier Madame Suzanne FOURNIER-DELPECH pour son aide lors de la mise au point de la technique de marquage.

BIBLIOGRAPHIE :

- AMANN R.P. and PICKETT B.W., 1987. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa, *Equine Vet. Sci.*, 7 (3), 145-173.
- CROSS N.L. and OVERSTREET J.W., 1987. Glycoconjugates of the human sperm surface : Distribution and alterations that accompany capacitation in vitro, *Gamete Res.*, 16, 23-35.
- FOUNIER-DELPECH S. and COUROT M., 1980. Glycoproteins of ram plasma membrane. Relationship of protein having affinity for Con. A to epididymal maturation. *Biochem. Biophysic. Res. Comm.*, 96, 756-761
- GOLDSTEIN I.J. and PORETZ R.D., 1986. Isolation and chemical properties of lectins. in The Lectins, Properties, Functions, and Applications in Biology and Medicine, Edité par I.E. LIENER, N. SHARON, et I.J. GOLDSTEIN, ACADEMIC PRESS INC, 43-67.
- KOEHLER J.K., 1980. Lectins as probes of the spermatozoon surface, *Arch. Androl.*, 6, 197-217.
- PALMER E., 1984. Factors affecting stallion semen survival and fertility. 10th International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination, University of Illinois Urbana Champaign USA, Communication n° 377.
- PALMER E., DOMERG D., FAUQUENOT A. et De SAINTE MARIE T., 1984. L'Insémination Artificielle des juments : Bilan de cinq années de recherches et d'utilisation pratique. dans Le Cheval, Reproduction, Sélection, Alimentation, Exploitation, Edité par INRA, PARIS, 133-147.
- SCHWARTZ M.A. and KOEHLER J.K., 1979. Alterations in lectin binding to guinea pig spermatozoa accompanying in vitro capacitation and the acrosome reaction. *Biol. Reprod.*, 21, 1295-1307.

TABLEAU 1 : PROTOCOLE EXPERIMENTAL :

DEFINITION DES LOTS ETUDIES EN FONCTION DES ETAPES OU ONT ETE REALISES LA FIXATION DE CON A 2 ET LES OBSERVATIONS

Etapas de la congélation Echantillons	Dilution	1 h à 4 °C	Addition	Congélation-Décongélation
	1	2	de glycérol 3	4
1(1)	_____ F-0			
2(2)	_____ F - 0			
3(3)	_____ F - 0			
4(4)	_____ F - 0			
3(2)	_____ F _____ 0			
4(2)	_____ F _____ 0			
4(3)	_____ F _____ 0			

F est le moment de fixation de la Con A 2 sur l'échantillon
 0 est le moment de la préparation et d'observation des lames

Les étapes subies par les spermatozoïdes sont matérialisées par des traits continus.

Définition des échantillons :

Les noms des lots sont donnés par le moment d'observation et le moment de fixation :

O(F)

- 1(1) : Fixation et observation après dilution du sperme
- 2(2) : " " " après la première descente de température (1h à 4°C)
- 3(3) : " " " après 45 mn d'équilibration dans le milieu glycérolé
- 4(4) : " " " après décongélation.
- 3(2) : " après 1h à 4°C et observation après 45 mn d'équilibration dans le milieu glycérolé
- 4(2) : " après 1h à 4°C et observation après décongélation.
- 4(3) : " après équilibration dans le milieu glycérolé et observation à la décongélation

TABLEAU 2 : LISTE DES VARIABLES CONSERVEES

VARIABLES DE MOBILITE

- * Mobilité globale : C'est le pourcentage, estimé à l'aide de l'HTM 2000, des spermatozoïdes dont la vitesse est supérieure à 20 μ/s .
- * Vitesse moyenne : C'est la moyenne des vitesses des spermatozoïdes.
- * Déplacement latéral de la tête : C'est 2 fois la distance maximale entre la tête du spermatozoïde et la trajectoire moyenne.

VARIABLES DE MORPHOLOGIE



- * Spermatozoïde normal : Post-acrosome plus marqué que l'acrosome et segment équatorial marqué.



- * Spermatozoïde altéré : Post-acrosome plus marqué que l'acrosome et segment équatorial non marqué.

- * Acrosome lisse : L'aspect de la membrane acrosomique est lisse.

- * Segment équatorial marqué

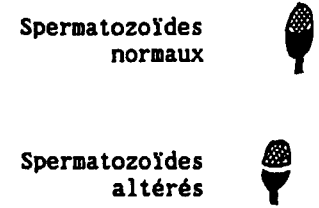
TABLEAU 3 : EVOLUTION DE L'ETAT DU SPERMATOZOÏDE AU COURS DES PHASES DU PROTOCOLE DE CONGELATION

Variables de mobilité

Seuils de signification

- p < 0,01 **
- p < 0,05 *
- Non Significatif NS

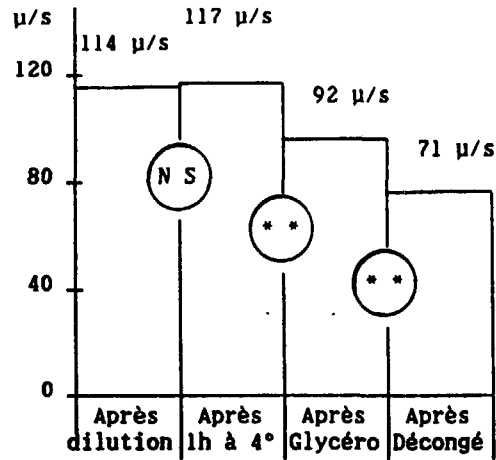
Etats des spermatozoïdes



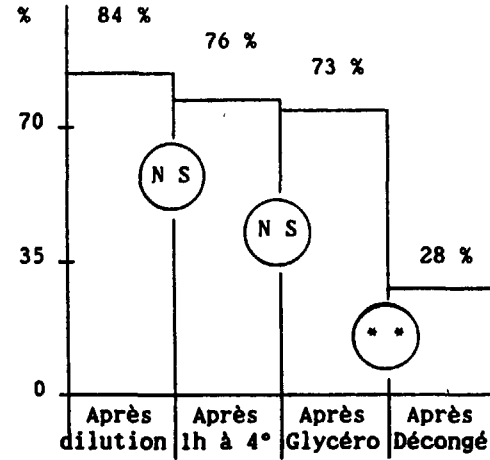
Combinaisons linéaires

- 1 : Effet de baisse de température
- 2 : Effet de l'addition de glycérol
- 3 : Effet de la congélation

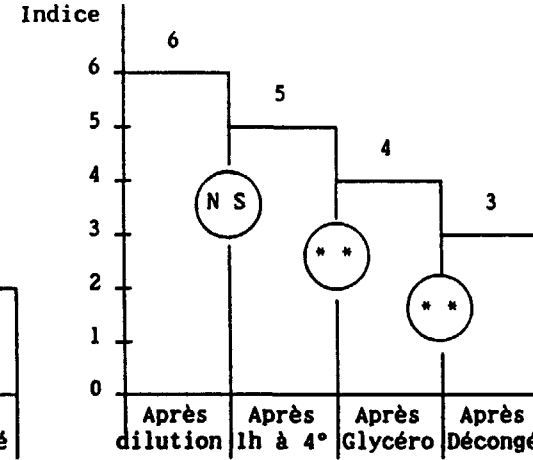
Vitesse



Mobilité



Déplacement latéral de la tête



LOTS 1(1) 2(2) 3(3) 4(4)

1(1) 2(2) 3(3) 4(4)

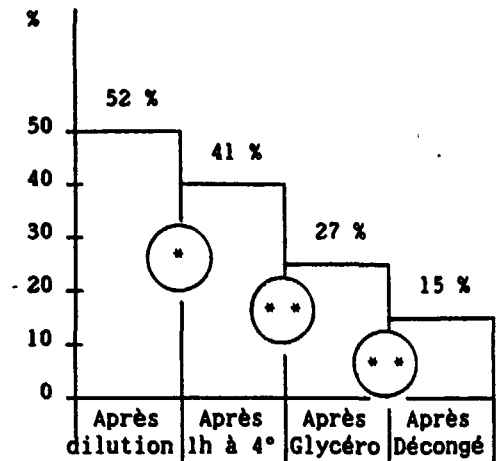
1(1) 2(2) 3(3) 4(4)

Combinaisons linéaires 1 2 3

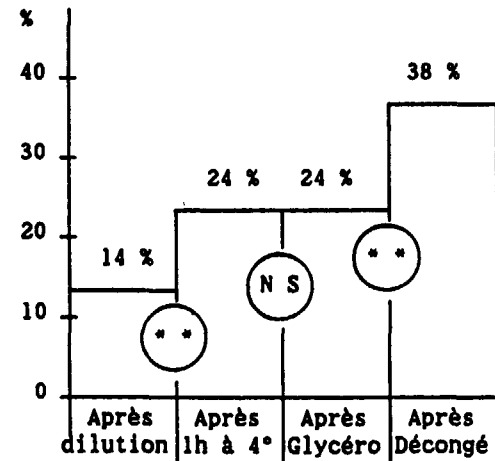
58

Variables morphologiques

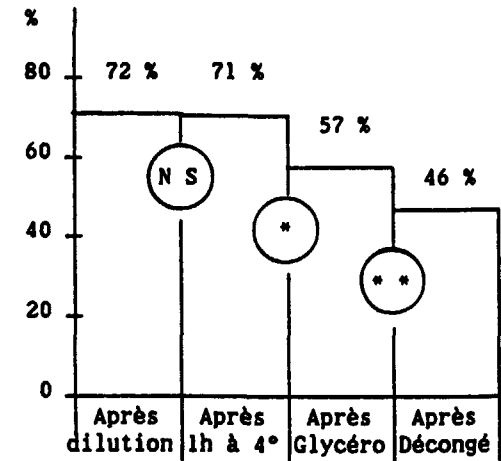
Spermatozoïdes Normaux



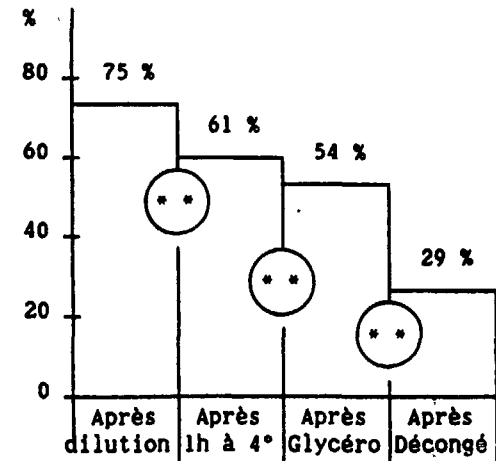
Spermatozoïdes altérés



Acrosomes lisses



Segment équatorial marqué



LOTS 1(1) 2(2) 3(3) 4(4)

1(1) 2(2) 3(3) 4(4)

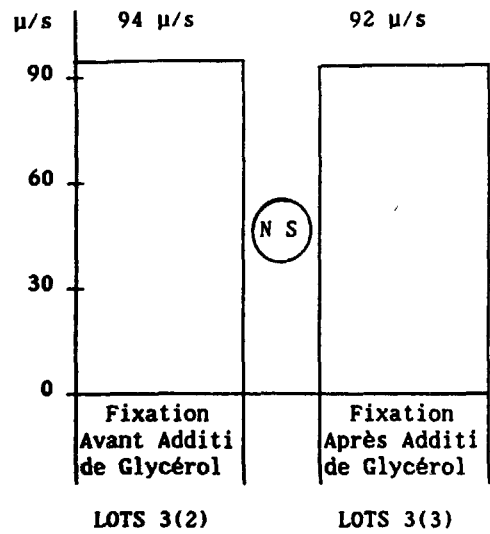
1(1) 2(2) 3(3) 4(4)

1(1) 2(2) 3(3) 4(4)

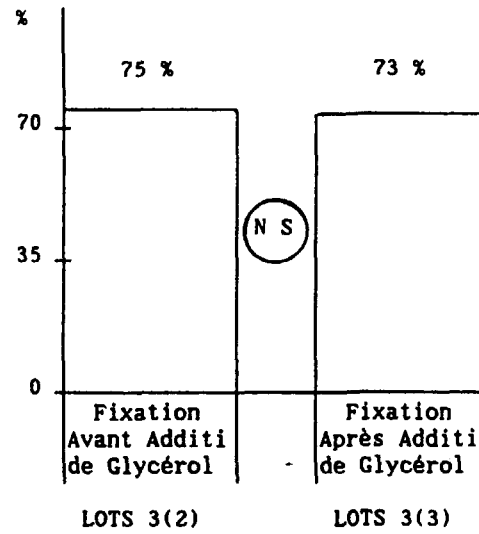
TABEAU 4 : EFFETS DE LA PRESENCE OU ABSENCE DE CON A 2 PENDANT L'ADDITION DE GLYCEROL OBSERVES AVANT CONGELATION

Variables de mobilité

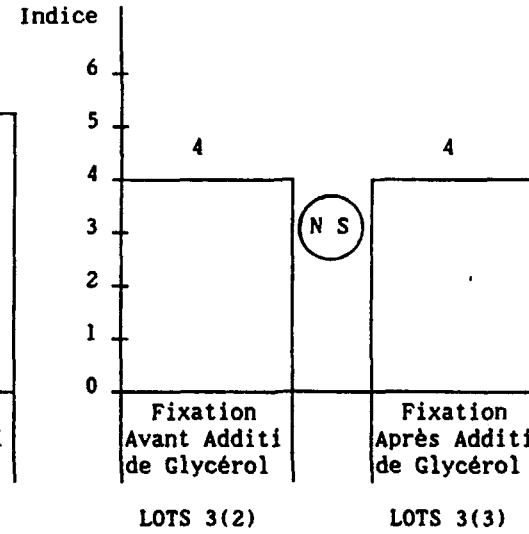
Vitesse



Mobilité



Déplacement latéral de la tête



Seuils de signification

p < 0,01 **

p < 0,05 *

Non Significatif NS

Etats des spermatozoïdes

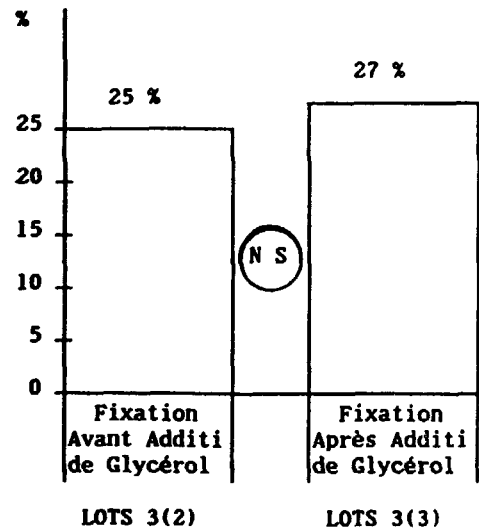
Spermatozoïdes normaux

Spermatozoïdes altérés

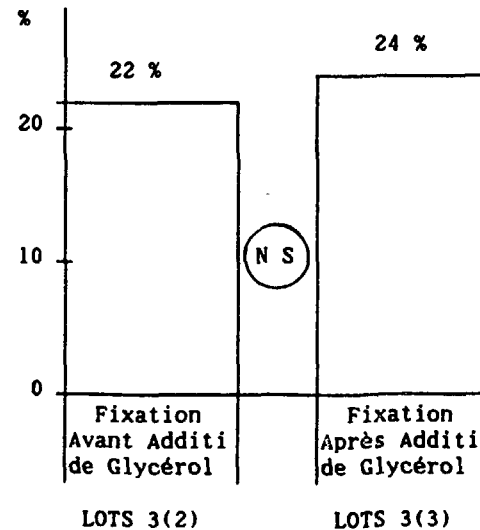
59

Variables morphologiques

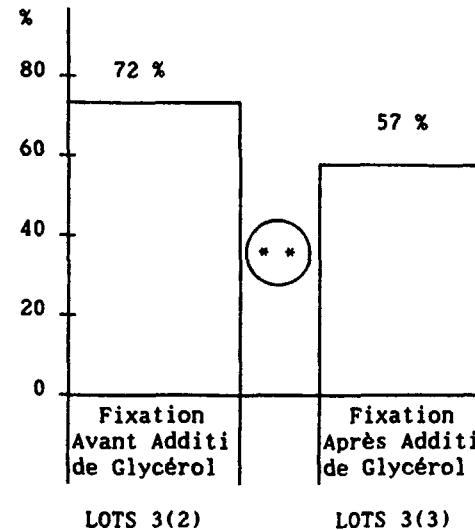
Spermatozoïdes Normaux



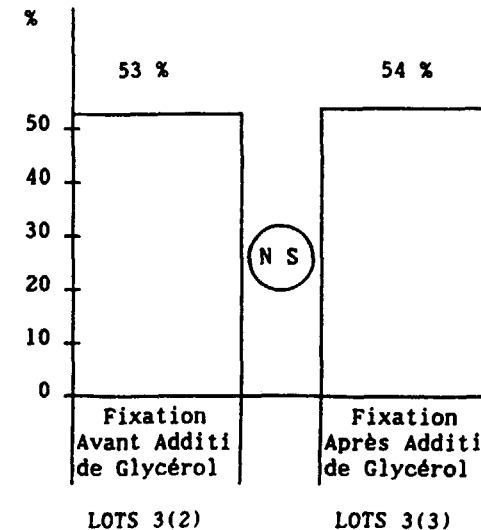
Spermatozoïdes altérés



Acrosomes lisses



Segment équatorial marqué



TABEAU 5 : EFFETS DE LA PRESENCE OU ABSENCE DE CON A 2 PENDANT L'ADDITION DE GLYCEROL OBSERVES APRES DECONGELATION

Variables de mobilité

Seuils de signification

p < 0,01 **

p < 0,05 *

Non Significatif NS

Etats des spermatozoïdes

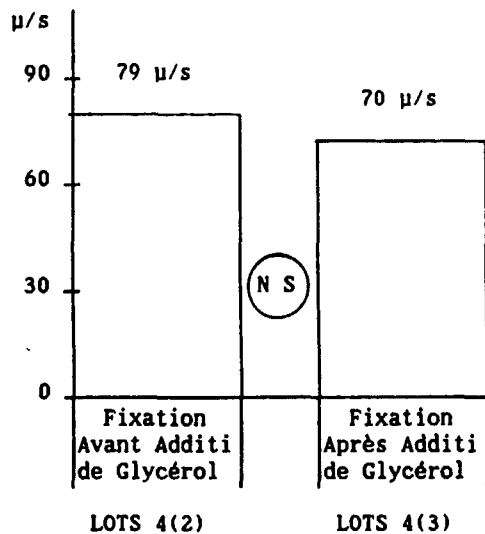
Spermatozoïdes normaux



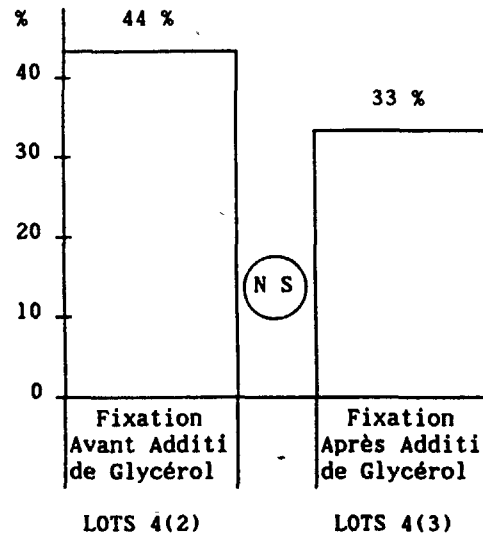
Spermatozoïdes altérés



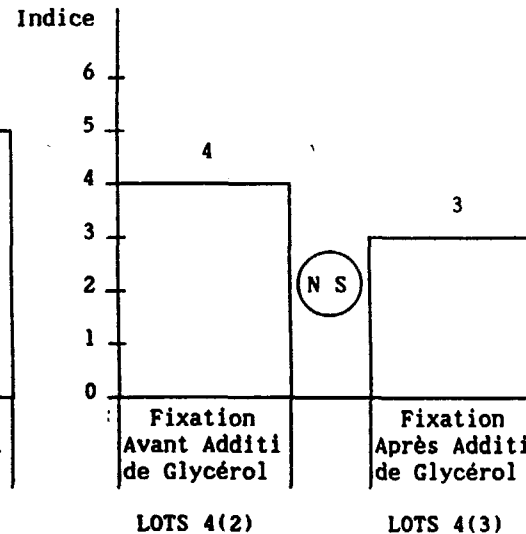
Vitesse



Mobilité

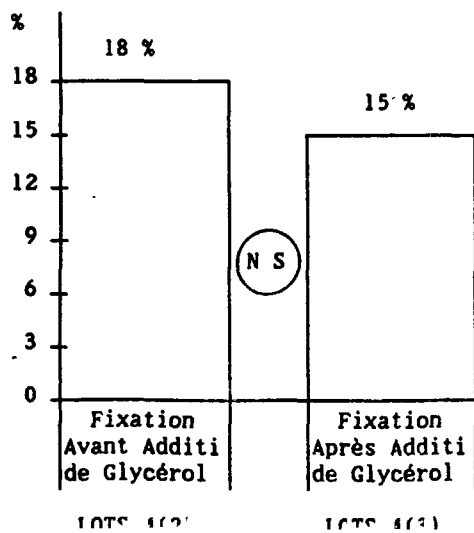


Déplacement latéral de la tête

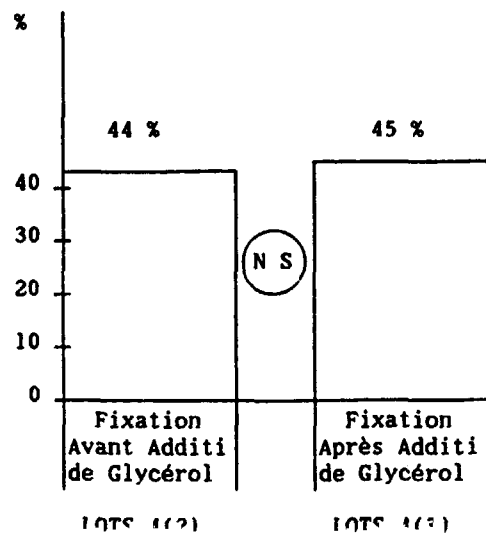


Variables morphologiques

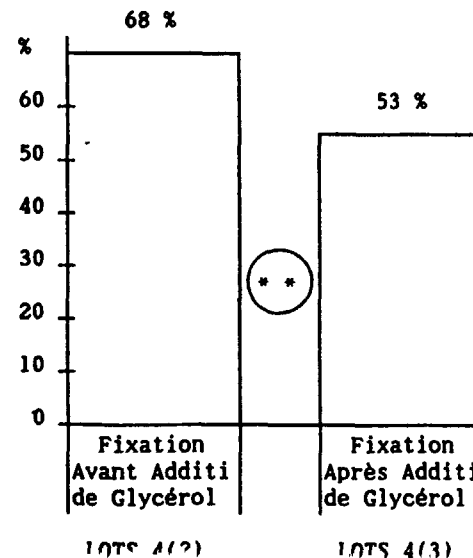
Spermatozoïdes Normaux



Spermatozoïdes altérés



Acrosomes lisses



Segment équatorial marqué

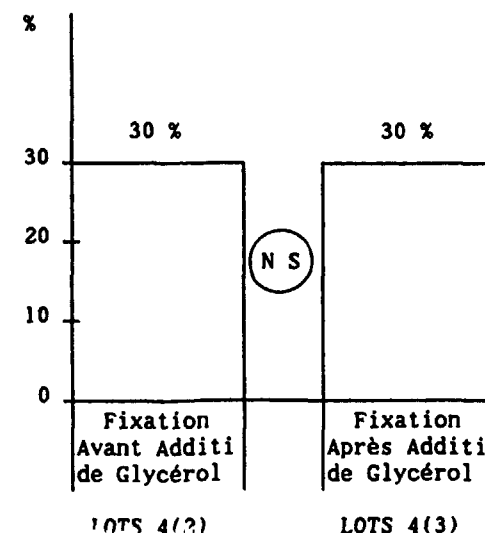


TABLEAU 6 : EFFETS DE LA PRESENCE OU ABSCENCE DE CON A 2 PENDANT LA CONGELATION-DECONGELATION OBSERVES APRES DECONGELATION

Seuils de signification


p < 0,01 **

p < 0,05 *

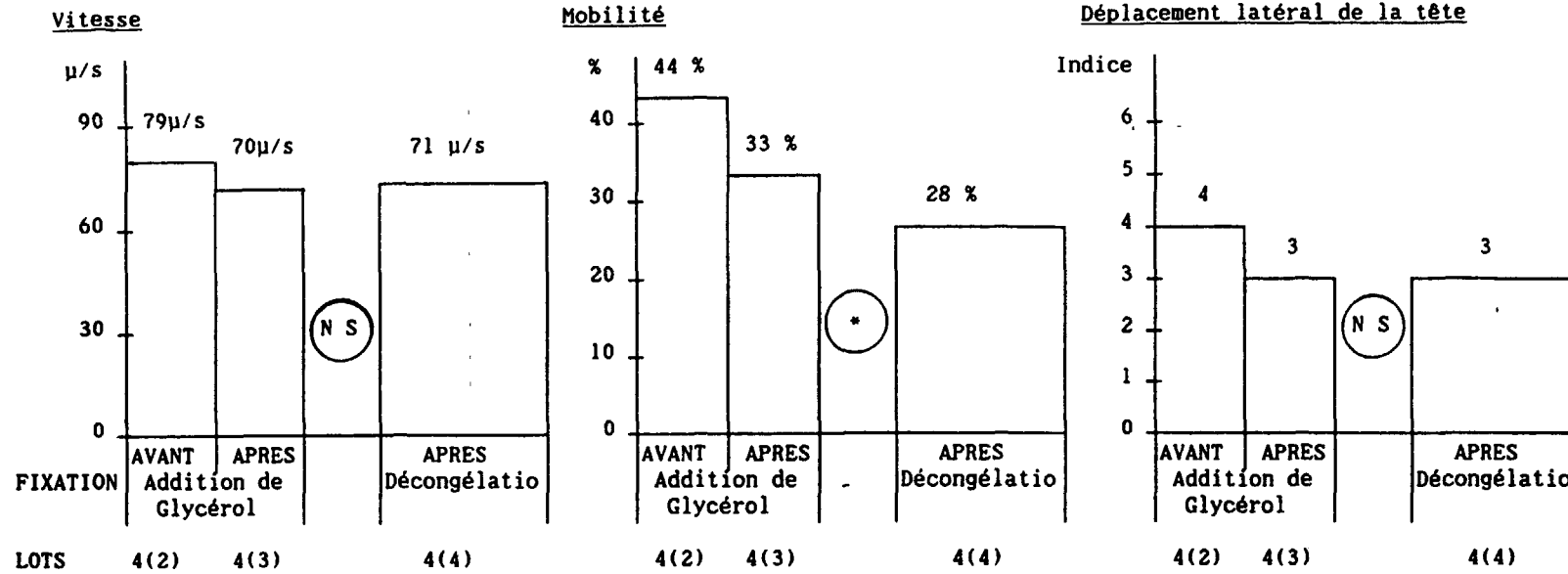
Non Significatif NS

Etats des spermatozoïdes

Spermatozoïdes normaux 

Spermatozoïdes altérés 

Variables de mobilité



19

Variables morphologiques

