

9 Mars 1988

ANALYSE MULTICRITERE DES CARACTERISTIQUES HORMONALES,
TESTICULAIRES ET SEMINALES D'UN GROUPE D'ETALONS

Par C. TINEL, M. MAGISTRINI
MM M.T. de REVIERS, P. NOUE, E. PALMER
INRA - Station de Physiologie de la
Reproduction
37380 MONNAIE

Résumé

Les caractéristiques hormonales, testiculaires et seminales de 19 étalons ont été analysées. Après une semaine de testage (réalisation d'un spermogramme ainsi que de 3 prises de sang par étalon et par jour pendant 4 jours) et une semaine de congélation (3 éjaculats par individu), ces animaux ont été abattus; un fragment testiculaire a été fixé pour analyse histologique, les queues des épидидymes et les canaux déférents ont été perfusés; le sperme obtenu a été observé frais puis congelé. Tous les échantillons congelés ont été observés en fin d'expérience. Les résultats montrent que la variabilité individuelle est importante pour toutes les caractéristiques étudiées; elle est maximale pour les données séminales quantitatives. La qualité du sperme perfusé (% de spermatozoïdes mobiles, vitalité, vitesse) est très liée à celle du sperme éjaculé, principalement après congélation. Cependant, les résultats hormonaux et histologiques sont peu corrélés à celle-ci. La variation individuelle entre étalons de l'aptitude à la congélation, démontrée au niveau du sperme éjaculé, se retrouve avec les mêmes fluctuations dans la queue de l'épididyme. La congélation semble donc se déterminer à un niveau antérieur dans le tractus génital.

MOTS CLES: ETALON, TESTICULE, SPERMATOZOIDE, EPIDIDYME, EJACULAT, CONGELABILITE.

Summary

The seminal, testicular and hormonal characteristics of 19 stallions were analysed. After a one week test (realisation of a spermogram and 3 blood samples x 4 days) and a week of freezing (3 ejaculates per individual), these animals were slaughtered. A testicular fragment of testis was fixed for the histological analysis. The epididymidis caudae and the proximal deferent ducts were perfused and the sperm collected were observed and then frozen. The results demonstrate that the individual variability is important for all the characteristics analysed and is maximal for the quantitative seminal data. The quality of the perfused sperm (percentage of motile spermatozoa, vitality, velocity) is very much linked to the quality of the ejaculated sperm, mainly after freezing. However, the histological and hormonal results are very weakly correlated to sperm parameters. The individual variation between stallions to freezability, demonstrated with the ejaculated sperm, is met again with the same fluctuations in the epididymidis caudae. The freezing capacity seems then to be determined at an earlier level in the genital tract.

1509



KEY-WORDS: STALLION, TESTIS, SPERMATOZOA, EPIDIDYMIS, EJACULATE, FREEZABILITY.

INTRODUCTION

De nombreux auteurs ont observé des variations des caractéristiques séminales au cours de l'année. Le volume de l'éjaculat, constitué en grande partie par les sécrétions des glandes annexes, subit de grandes variations saisonnières avec un maximum en été et un minimum en hiver (CORNWELL et al, 1972; PICKETT et al, 1975a et 1976). Il semblerait donc que les sécrétions des glandes annexes diminuent elles aussi pendant l'hiver. On a observé également une meilleure congélabilité du sperme hors saison de reproduction, c'est à dire au moment où les sécrétions des glandes annexes sont les plus faibles (OSHIDA et al, 1972; MAGISTRINI et al, 1987). Enfin, la variabilité individuelle de la congélabilité du sperme est très grande. Notre objectif a donc été de comparer les caractéristiques et la congélabilité du sperme éjaculé et du sperme de la queue de l'épididyme et du début du canal déférent d'un certain nombre d'étalons, afin de déterminer l'influence des sécrétions des glandes annexes sur la qualité du sperme. Nous avons complété nos observations par des données hormonales et histologiques.

MATERIEL ET METHODES

1. Animaux et Protocole (Tableau 1).

Dix neuf étalons, répartis en lots de 2 ou 3, ont été soumis à cette expérimentation, qui s'étendait sur 2 semaines pour chacun d'eux. L'échantillon ainsi constitué était très hétérogène du point de vue de l'âge des animaux (de 3 à 17 ans) et de la saison d'expérimentation (du mois d'Avril au mois de Décembre).

Chaque jour de la première semaine, les étalons ont subis 3 prises de sang à 1 heure d'intervalle pour analyse hormonale suivies de collecte de sperme pour la réalisation d'un spermogramme (Palmer et al, 1984). La deuxième semaine, 3 éjaculats, récoltés à 48 h d'intervalle, ont été congelés selon Palmer (1984). Les étalons ont été abattus le lundi de la troisième semaine, les testicules disséqués, les épидидymes et canaux déférents perfusés. Le sperme perfusé obtenu a été observé puis congelé selon le même protocole que le sperme éjaculé.

2. Observation du sperme frais.

Les observations sur le sperme éjaculé frais sont celles préconisées pour la réalisation d'un spermogramme. De plus la vitalité a été estimée par la coloration à l'éosine-nigrosine (ORTAVANT et al, 1952). Pour le sperme perfusé, 4 échantillons (queue de l'épididyme et début du canal déférent, droite et gauche) ont été soumis aux mesures suivantes: nombre de spermatozoïdes collectés, mobilité et anomalies morphologiques. Une classification simplifiée des anomalies a été utilisée: anomalies de tête, de pièce intermédiaire (gouttelette cytoplasmique), de flagelle (coudé ou enroulé).

SEMAINE 1

- Spermogramme (5jrs x 1 ej)
- Prélèvements sanguins (4jrs x 3 prel)

SEMAINE 2

- Recoltes (3jrs x 1 ej)
- Mesures des caractéristiques séminales
- Estimation de la qualité de la semence diluée
- Congélation du sperme éjaculé

SEMAINE 3

- Abattage (Lundi)
- Dissection des testicules
- Perfusion des épидидymes et canaux déférents
- Congélation de la semence perfusée
- Fixation des prélèvements testiculaires pour
l'étude histologique

TABLEAU 1: PROTOCOLE EXPERIMENTAL

3. Observation du sperme congelé

Les paillettes de sperme éjaculé et perfusé ont été stockées à -196 C dans l'azote liquide jusqu'à la fin de l'expérience. Elles ont été décongelées et observées "en aveugle" au cours d'une seule période. La mobilité a été observée sur enregistrement vidéo et la vitalité comme précédemment. La motilité des spermatozoïdes a été analysée par un analyseur de motilité (appareil HTM 2000); Celui-ci indiquait la vitesse de déplacement des spermatozoïdes, sur une trajectoire déterminée (micron/s) et un rapport de linéarité: distance réellement parcourue / distance entre le point de départ et le point d'arrivée pour un intervalle de temps donné (0,94 seconde).

4. Dosages hormonaux.

Ce sont des dosages radio-immunologiques. Ils nous donnent les taux d'hormones hypophysaires (LH et FSH), et les taux d'hormones testiculaires (testostérone et oestrogènes totaux conjugués) présents dans le sang périphérique (ng/ml).

5. Observations histologiques.

Pour l'étude histologique, les prélèvements testiculaires ont été coupés, colorés, montés entre lame et lamelles, puis observés au microscope optique pour la réalisation de comptages et de mesures (Chakley, 1943).

Nous avons éliminé toute caractéristique directement expliquée par le poids testiculaire.

Nous avons considéré 4 caractéristiques de l'importance relative des différents compartiments du testicule: diamètre des tubes séminifères (m), volume relatif des tubes séminifères dans le testicule (%), nombre de cellules de Sertoli par coupe de tube séminifère, volume relatif des cellules de Leydig dans l'intertubulaire (%), et 4 autres caractéristiques du fonctionnement de ces compartiments: nombre de spermatides rondes par coupe de tube séminifère, surface des spermatides rondes (m), surface des noyaux des cellules de Sertoli (m^2) et volume moyen des cellules de Leydig (m^3).

6. Analyses statistiques.

Toutes les données séminales et hormonales ci-dessus étaient répétées, ce qui a permis la réalisation d'une analyse de variance factorielle qui a mis en évidence un effet étalon significatif ($p < 0,01$). Ces variables sont donc représentatives des individus qui peuvent être caractérisés par la moyenne des mesures répétées. De même, les mesures faites sur les échantillons de l'épididyme et du canal déférent gauche et droit présentant un "effet étalon" ont été regroupées sous le terme de sperme perfusé. La recherche de relations entre les différentes caractéristiques étudiées a été faite à partir des corrélations linéaires entre les caractéristiques moyennes des individus. Pour $n=19$, le seuil de signification du coefficient de corrélation est $r=0,55$ ($p < 0,01$).

RESULTATS ET DISCUSSION

1. Mise en évidence de la variabilité entre étalons

Nous avons sélectionné parmi toutes les données à notre disposition, celles caractérisant le mieux les individus à l'intérieur de notre groupe d'étalons (tableau 2).

Le rapport des valeurs Max/Min (R) de chacune des caractéristiques, illustre leur variabilité entre les 19 individus:

1<R<5.les variables de ce groupe sont celles qui différencient le moins les individus entre eux. Ce sont la vitalité la vitesse et le rapport de linéarité, les variables histologiques et la mobilité du sperme frais éjaculé.

5<R<10. ce groupe comprend la mobilité des spermés perfusés frais et congelé, les anomalies de gouttelettes du sperme perfusé, les flagelles coudés ou enroulés du sperme éjaculé, les anomalies de tête des spermés éjaculé et perfusé, et le taux de testostérone.

10<R<20. les 4 variables déterminant ce groupe subissent des variations individuelles très importantes; il s'agit de la mobilité du sperme éjaculé congelé, des anomalies de gouttelettes cytoplasmiques du sperme éjaculé et de flagelles coudés ou enroulés du sperme perfusé et enfin du taux d'oestrogènes totaux conjugués.

Enfin dans le groupe de variables dont $R > 20$, on trouve les caractéristiques séminales quantitatives du sperme éjaculé (volume concentration et nombre total) le nombre total de spermatozoïdes du sperme perfusé (épididyme et déférent) et les taux de FSH et LH qui présentent les variations individuelles les plus importantes.

2. Analyse des variables et de leurs corrélations.

La recherche des relations entre les paramètres montre de nombreuses corrélations entre mesures faites sur le même type de prélèvement (sanguin, testiculaire ou séminal) mais peu de relations entre mesures sur des prélèvements d'origine différente.

C'est pourquoi nous présenterons les corrélations entre caractéristiques hormonales, puis histologiques et enfin séminales.

b. Caractéristiques hormonales.

Quelle que soit l'hormone, les résultats des dosages des 12 prélèvements sanguins de chaque individu étaient remarquablement homogènes. Par contre l'analyse a montré que les variations individuelles sont très marquées.

Une liaison importante a été trouvée entre les hormones gonadotropes FSH et LH ($r = +0,88$). Les sécrétions de FSH et LH sont toutes deux stimulées par le GnRH; il est donc normal d'observer une telle liaison. Cependant leur contrôle

Nom des variables		MAX	MIN	R = $\frac{\text{MAX}}{\text{MIN}}$	\bar{X}	σ	COEF VAR	
Sperme frais	Spermogramme {	Volume (ml)	122.0	5.7	21.0	43.9	26.9	61.3
		Concentration (10^6 /ml)	593.5	16.6	35.0	194.4	128.7	66.2
		Nbre total (10^9)	18.6	0.6	31.0	7.5	5.2	69.8
		Mobilité (%)	72.2	20.2	3.5	54.6	14.6	26.8
		Vitalité (%)	78.8	52.5	1.5	67.0	8.9	13.3
	Nbre total queue epid. (10^9)	21.8	0.8	27.0	6.7	5.3	80.2	
	Nbre total canal déf. (10^9)	5.1	0.2	25.0	2.1	1.4	64.0	
	Mobilité perfusé (%) frais (épid. + déf.)	65.2	10.2	6.0	36.5	16.9	46.4	
Sperme congelé	Mobilité (%) éjaculé congelé	47.7	3.2	15.0	31.6	12.1	38.3	
	Vitalité (%) " "	57.8	30.6	1.8	47.8	8.1	16.9	
	Vitesse (μ /s) " "	75.3	31.1	2.4	54.6	12.1	22.1	
	Rapport linearité " "	1.7	1.3	1.3	1.5	0.1	7.6	
	Mobilité (%) perfusé congelé	51.2	8.3	6.0	37.0	10.8	29.3	
	Vitalité (%) " "	63.8	45.0	1.4	55.4	5.0	9.1	
	Vitesse (μ /s) " "	82.9	30.7	2.7	61.3	12.0	20.0	
	Rapport linearité " "	1.9	1.4	1.3	1.6	0.1	8.6	
Morphologie des SPZ	Anomalie gouttelette éjaculé (%)	18.0	1.6	11.0	7.9	5.7	72.5	
	Anomalie coudé enroulé " (%)	30.8	4.9	6.0	13.4	7.1	53.0	
	tête anomalie (%) "	19.0	2.2	8.6	7.1	3.8	54.6	
	Anomalie gouttelette perfusé (%)	54.7	6.2	8.8	27.2	14.8	54.5	
	Anomalie coudé enroulé " (%)	33.0	2.3	14.0	9.8	6.8	69.7	
	tête anomalie (%) "	15.7	2.3	6.8	6.7	4.1	61.7	
Taux hormonaux	Taux de LH (ng/ml)	14.6	0.0	1460.0	2.6	3.5	133.7	
	Taux de FSH (ng/ml)	31.9	1.1	29.0	8.5	6.6	77.9	
	Taux de Testostérone (ng/ml)	1.3	0.2	6.9	0.5	0.2	52.5	
	Taux d'Oestrogènes (ng/ml)	163.5	8.6	19.0	63.5	37.2	58.5	
HISTOLOGIE	Vol. relatif tubes sémin (%)	75.7	58.2	1.3	69.9	4.0	5.7	
	Vol. relatif cell. de Leydig dans l'intertubulaire (%)	56.2	28.2	1.9	43.4	6.8	15.7	
	Nbre de cell. de Sertoli par coupe de tube séminifère	30.3	9.2	3.2	19.0	4.8	25.3	
	Diamètre tubes sémin. (μ m)	243.8	168.0	1.4	212.7	18.8	8.8	
	Surface noyaux cell. Sertoli (μ m ²)	69.5	41.8	1.6	57.9	7.6	13.2	
	Vol. moyen des cell. Leydig (μ m ³)	2827.0	594.0	4.7	1790.9	587.2	32.7	
	Nbre spermatides rondes par coupe de tube séminifère	98.0	44.2	2.2	70.9	15.0	21.2	
	Surface des spermatides rondes (μ m ²)	59.1	38.7	1.5	46.4	5.0	10.9	

TABLEAU 2: Variabilité entre étalons des différentes caractéristiques analysées: valeur maximum et minimum des variables, leur rapport (R), leur moyenne (\bar{X}), l'écart type (σ) et le coefficient de variation.

différentiel par l'inhibine est bien connu mais n'apparaît pas ici.

On a constaté également une corrélation entre les hormones stéroïdes (testostérone et oestrogènes totaux conjugués $r = + 0,62$). La corrélation entre testostérone et oestrogènes totaux conjugués s'expliquent par le fait que la testostérone est le précurseur de l'estradiol dans la biosynthèse des stéroïdes.

Cependant nous ne trouvons pas de liaison entre testostérone et LH alors que la LH stimule la sécrétion de testostérone par les cellules de Leydig (Amann, 1981) et qu'en retour la testostérone exerce un effet feed-back sur la sécrétion de LH.

b. Caractéristiques histologiques.

Les caractéristiques décrivant les différents compartiments du testicule et leurs fonctionnements ne présentent pas de grande variabilité. En effet, la taille de cellules dans un organe ne peut guère varier d'un individu à l'autre.

Concernant les rapports des différents compartiments les uns par rapport aux autres, on peut remarquer que le diamètre des tubes séminifères est corrélé ($r = +0,55$) avec la surface des noyaux des cellules de Sertoli: ainsi plus les cellules de Sertoli sont actives plus le diamètre des tubes séminifères est grand.

Nous avons trouvé une corrélation négative entre la saison et la surface des noyaux des cellules de Sertoli ($r = -0,56$) et une autre plus faible entre la saison et la surface des spermatides rondes ($r = -0,53$), tendant à montrer que les cellules somatiques nourricières des cellules germinales et les spermatides rondes seraient plus grosses au début de la saison de reproduction. Par contre Johnson & Thompson (1983) et Johnson & Nguyen (1986) ont mis en évidence une augmentation du nombre de cellules de Sertoli en saison de reproduction que nous n'avons pas observée.

Nous observons une corrélation négative entre le nombre de cellules de Sertoli et les taux de FSH et LH ($r = -0,659$, $r = -0,55$); les cellules de Sertoli secrètent l'inhibine qui exerce un rétro-contrôle sur la FSH: l'interprétation serait qu'à un nombre élevé de Sertoli correspond une quantité importante d'inhibine entraînant un taux de FSH bas. La liaison avec LH s'explique par la liaison LH-FSH vue plus haut. Cependant notre étude ne montre aucune corrélation hormonale avec les cellules de Leydig qui sont les cellules sécrétoires du testicule.

Notre étude n'a pas mis en évidence de relations entre les caractéristiques histologiques et la production de sperme.

c. Caractéristiques séminales.

* Quantitatives.

C'est au niveau de ces variables que l'on observe la plus grande variabilité individuelle (tableau 2). En effet le volume et la concentration de l'éjaculat varient beaucoup d'un individu à l'autre (5,7ml à 79,2ml, 16,6 à 583,5.10⁶/ml respectivement), de même que le nombre total de spermatozoïdes dans l'éjaculat, la queue de l'épididyme et le début du canal déférent (0,6 à 18,6.10⁹, 0,8 à 21,8.10⁹ et 0,2 à 5,1.10⁹ respectivement).

Ces 3 dernières caractéristiques sont corrélées positivement entre elles (tableau 3). On constate également une corrélation entre la concentration de l'éjaculat et le nombre de spermatozoïdes dans la queue de l'épididyme ($r = +0,76$).

Enfin il existe une corrélation positive entre le poids du testicule et le nombre de spermatozoïdes, ce qui justifie l'appréciation du volume du testicule comme critère d'examen des étalons.

* Qualitatives.

La qualité du sperme a été estimée à l'aide de 4 variables: le sperme éjaculé frais par la mobilité (%) et la vitalité (%) les spermatozoïdes éjaculé et perfusé congelé par la mobilité (%), la vitalité (%), la vitesse et le rapport de linéarité.

On a observé une corrélation ($r = +0,72$) entre la mobilité du sperme éjaculé frais et celle du sperme éjaculé congelé. Elle montre que les étalons dont le sperme est le plus mobile à la décongélation sont ceux dont le sperme était le plus mobile à la récolte.

La qualité du sperme éjaculé congelé est significativement ($p < 0,01$) plus faible que celle du sperme perfusé congelé (tableau 4). Ceci semble indiquer que la "congélabilité" de la semence diminue lors du processus d'éjaculation et que les glandes annexes jouent un rôle fragilisant. Nos résultats sont en accord avec ceux de Johnson et al (1980), qui, après comparaison de sperme en provenance de différentes parties de l'épididyme et de sperme éjaculé, ont montré que le sperme de la queue de l'épididyme était plus résistant au "cold shock" que le sperme éjaculé.

Après congélation-dégel, les corrélations entre sperme éjaculé et perfusé (tableau 5), nous montrent que les étalons dont la qualité du sperme éjaculé congelé est la meilleure sont ceux dont la qualité du sperme perfusé congelé est également la meilleure.

Ceci tend à prouver que la qualité du sperme est déjà déterminée dans la queue de l'épididyme.

Une liaison existe aussi entre la mobilité et la vitesse du sperme éjaculé congelé que l'on retrouve dans le sperme perfusé congelé. Cette relation générale entre pourcentage de spermatozoïdes mobiles et vitesse de déplacement demande à être vérifiée et approfondie car elles pose des problèmes méthodologiques.

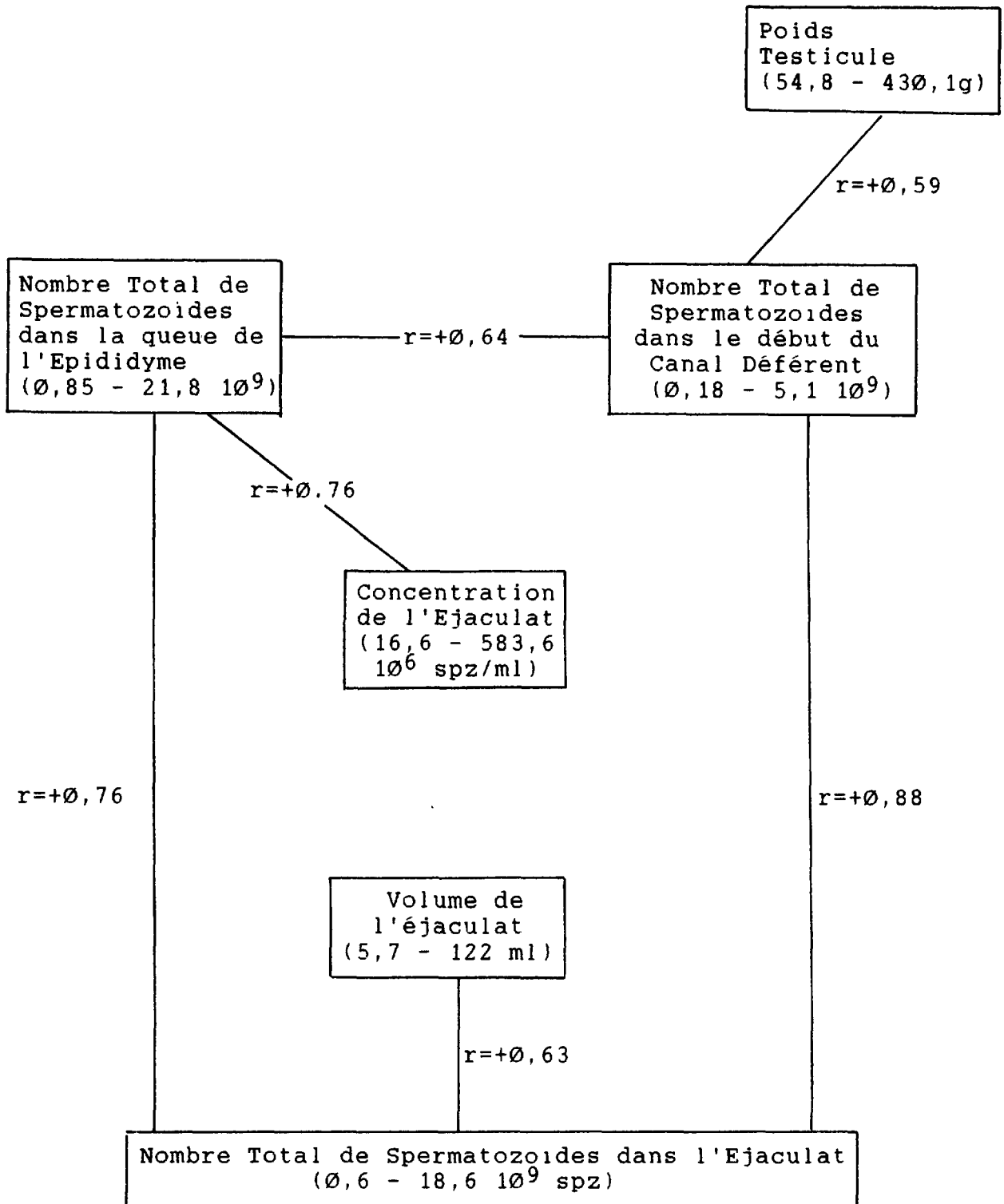


TABLEAU 3: Corrélations entre les caractéristiques quantitatives du sperme frais de l'éjaculat de la queue de l'épididyme et du canal déférent. (valeur minimum - valeur maximum) La corrélation est significative ($p < 0,01$) quand $r > 0,55$.

	SPERME EJACULE		SPERME PERFUSE
MOBILITE (%) (Congelé)	31,6	< **	37
VITALITE (%) (Congelé)	47,9	< **	55,5
VITESSE (µ/s) (Congelé)	54,6	< **	61,4
RAPPORT DE LINEARITE (Congelé)	1,5	< **	1,6

TABLEAU 4: Comparaison entre le sperme éjaculé et le sperme perfusé après congélation-dégel.
Seuil de signification: ** = 1%

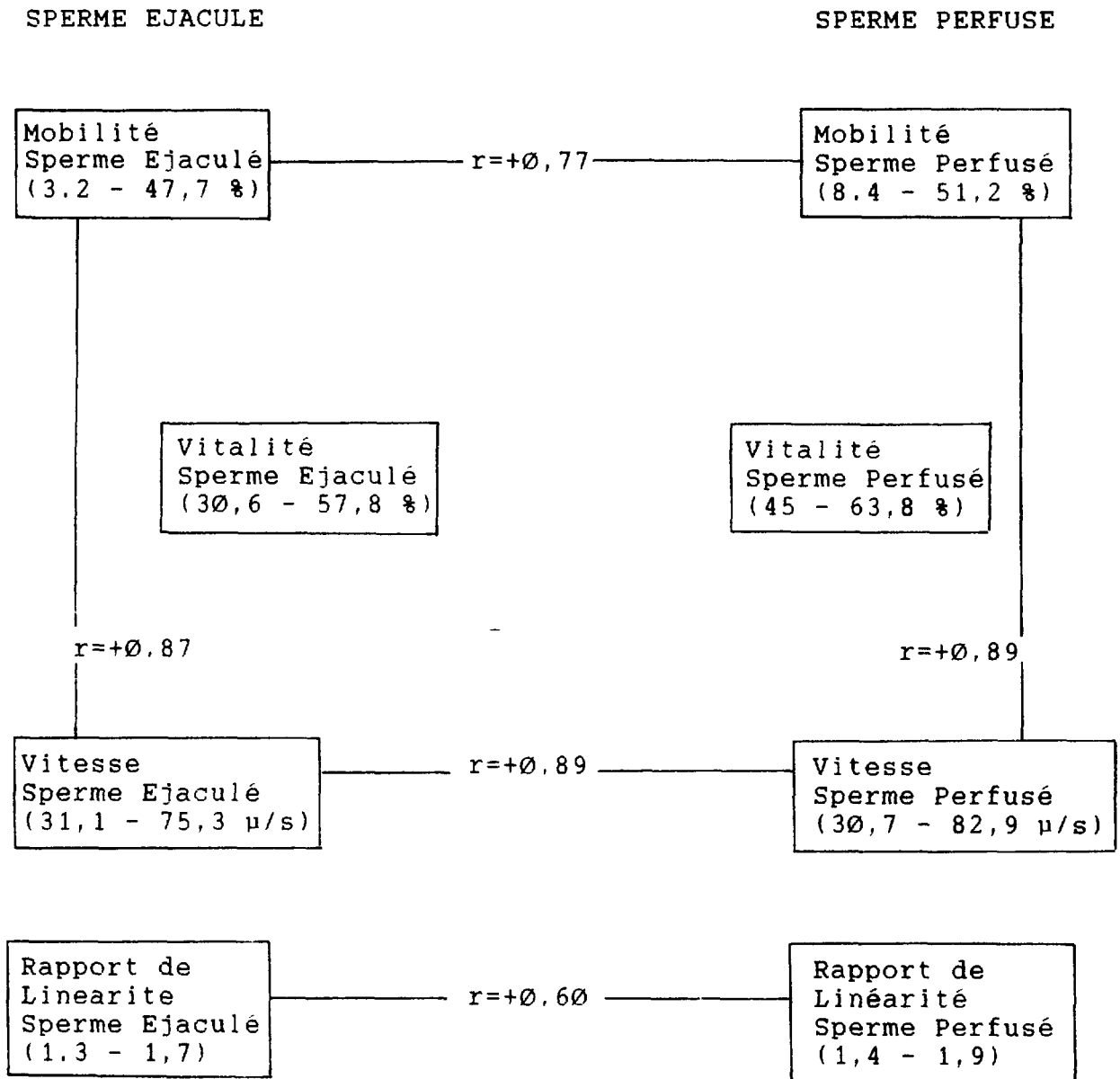


TABLEAU 5: Corrélations entre les caractéristiques qualitatives après congélation-dégel du sperme éjaculé et du du sperme perfusé.
 (valeur minimum - valeur maximum)
 la corrélation est significative ($p < 0,01$) quand $r > 0,55$.

CONCLUSION

Les individus de notre groupe de 19 étalons se différencient principalement par:

- leurs niveaux hormonaux
- leurs caractéristiques séminales quantitatives
- leurs caractéristiques séminales qualitatives.

L'analyse des caractéristiques séminales qualitatives nous a permis de montrer que:

- la mobilité du sperme congelé peut être partiellement prédite par la mobilité du sperme frais.
- pendant le processus d'éjaculation, les sécrétions des glandes annexes diminuent la congélabilité du sperme.
- la variabilité observée chez les étalons après éjaculation est déjà établie dans la queue de l'épididyme.

Ainsi on peut supposer que la qualité du sperme éjaculé congelé dépend de facteurs intervenant avant la queue de l'épididyme.

REMERCIEMENTS

Nous remercions Ch. PERREAU, A. FAUQUENOT, F. LESCOT et T. BRIDONNEAU pour leur aide technique.

BIBLIOGRAPHIE

- AMANN R.P., 1981. A review of anatomy and physiology of the stallion. *J. Eq. Vet. Sci.*, 1 (3), 83-105.
- CHAKLEY H.W., 1943. Method for the quantitative morphologic analysis of tissues. *J. Natl. Cancer. Inst.*, 4, 47.
- CORNWELL J.C., GUTHRIE L.D., SPILLMAN T.E., MACCRAINE S.E., HAVER E.P., VINCENT C.K., 1972
Seasonal variation in stallion semen.
J. An. Sci., 34 (2), 353.
- JOHNSON L., AMANN R.P., PICKETT B.W., 1980. Maturation of equine epididymal spermatozoa. *Am. J. Vet. Res.*, 41 (8), 1190-1196.
- JOHNSON L., NGUYEN H.B., 1986. Annual cycle of Sertoli cell population in adult stallions. *J. Reprod. Fert.*, 76, 311-316.
- JOHNSON L., THOMPSON D. L., 1983. Age related and seasonal variation in the Sertoli cell population, daily production and serum concentrations of follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone and testosterone in stallions. *Biol. Reprod.*, 29 (3), 777-790.
- MAGISTRINI M., CHANTELOUBE Ph., PALMER E., 1987
Influence of season and frequency of ejaculation on production of stallion semen for freezing.
J. Reprod. Fert., suppl. 35, 127-133
- ORTAVANT R., 1952. Contribution à l'étude de la différenciation des spermatozoides morts et des spermatozoides vivants dans le sperme de taureau. *Ann. Zootech.*, I, 5-12.
- OSHIDA H., TOMISUKA T., MASAKI J., HANADA A., NAGASE H., 1972
Some observations on freezing of stallion semen.
Proc. 7th Int. Cong. An. Reprod. & AI, Munich, 2, 1934-1937.
- PALMER E., 1984 Factors affecting stallion semen survival and fertility. *Proc. 10th Int. Cong. Anim. Reprod. & AI Urbana-Champaign*, 3, 377, Abstr.
- PALMER E., FAUQUENOT A., 1984. Mesure et prédiction de la fertilité des étalons. Etude méthodologique. *Le Cheval*, 1984, 113-127.
- PICKETT B.W., FAULKNER L.C., VOSS J.L., 1975a. Effect of season on some characteristics of stallion semen. *J. Reprod. Fert.*, Suppl 23, 25-28.
- PICKETT B.W., FAULKNER L.C., SEIDEL G.E., BERNDSTON W.E., VOSS J.L., 1976 Reproductive physiology of the

stallion . VI: Seminal and behavioural characteristics.
J. An Sci., 43, 617-625.