

1519

15ème Journée d'Etude

8 Mars 1989



COMPORTEMENT DANS LE TEMPS DU SPERME FRAIS REFRIGERE.  
COMPARAISON DE DIFFERENTS DILUEURS A L'AIDE DE L'ANALYSEUR  
HAMILTON-THORN.

C. Guintard, M.C. Dupuy, J. Blanchard\*, H. Al-Timimi et P. Silberzahn. Laboratoire de  
Biochimie, URA CNRS 59, Université CAEN. \* Haras de Villepelée, 61200 Sées. France

**Résumé**

La détermination de la demi-vie des spermatozoïdes mobiles à 37°C à l'aide d'un analyseur de semence Hamilton Thorn HTM 2030 a permis de montrer que le sperme de cheval subissait une altération importante de sa capacité de survie lors de conservation entre 0 et 48 h à 4°C et que cette altération pouvait être variable selon le dilueur. La seule observation microscopique des pourcentages de survie en cours de stockage ne permettait pas de la mettre en évidence.

Mots-clés :

Cheval- analyseur de semence-spermatozoïdes-demi-vie-dilueur.

**Summary**

The half-life of motile spermatozoa at 37°C was determined by means of a semen analyser Hamilton Thorn HTM 2030. It was shown that the survival ability of stallion sperm is lowered during storage at 4°C in a level which may depends on the semen extender. The isolated microscopic examination during storage cannot allow to notice this alteration.

Key-words :

Horse-semen analyser-spermatozoa-half-life-semen extender.

# COMPORTEMENT DANS LE TEMPS DU SPERME FRAIS REFRIGERE. COMPARAISON DE DIFFERENTS DILUEURS A L'AIDE DE L'ANALYSEUR HAMILTON-THORN.

## **Introduction**

Bien que la motilité du spermatozoïde et son pouvoir fécondant puissent être dissociés dans certaines conditions (Mann 1975), l'estimation de la motilité des spermatozoïdes est l'un des principaux moyens d'évaluation du pouvoir fécondant d'un sperme (Guraya 1987). Même parvenu à l'ovule, un vigoureux battement de la queue est encore nécessaire au spermatozoïde pour pénétrer la corona radiata (Nelson 1985). En pratique, l'évaluation d'un sperme est généralement effectuée par un examen microscopique permettant d'estimer le nombre de spermatozoïdes mobiles et leur degré de motilité. Différents dilueurs pour le sperme de cheval ont ainsi été comparés par une mesure isolée "statique" du pourcentage de spermatozoïdes mobiles après 24, 48,72 h etc..de conservation à 4°C (Palmer 1978)

Nous avons récemment proposé d'évaluer de façon "cinétique" les échantillons de sperme par détermination d'un indice de 1/2 vie à 37°C de la population de spermatozoïdes mobiles (Silberzahn et coll.1989). Dans le travail que nous exposons ici, nous avons comparé l'évolution du taux de survie à 37°C des spermatozoïdes conservés 0, 24, et 48h à 4°C et leurs indices de 1/2 vie, après dilution dans deux dilueurs couramment utilisés.

## **Matériel et méthodes**

Dilueur "DLI" (1l de lait écrémé +1l d'eau distillée contenant : glucose 50 g + lactose 3 g+ raffinose 3 g + citrate de sodium 0,6 g + citrate de potassium 0,82 g).

Dilueur "DLII" (poudre de lait écrémé 2,4 g + glucose 4,9 g+ eau distillée 100 ml).

Les spermes étudiés proviennent d'étalons Selle français, de bonne fertilité en sperme frais et sperme frais-réfrigéré. Le sperme a été prélevé au mois de Décembre-Janvier sur des étalons soumis à deux prélèvements par semaine. Les éjaculats, filtrés lors du prélèvement, ont été

partagés et dilués dans DLI et DLII jusqu'à l'obtention d'une concentration de  $50 \cdot 10^6$  spermatozoïdes par ml. Des aliquots ont été prélevés juste après dilution (D0), et après conservation pendant 24h (D1) et 48h (D2) à 4°C dans un tube (11x73 mm) placé verticalement et agité avant prélèvement. Chaque aliquot a été analysé à 37°C toutes les 5 minutes (aux temps T0, T+5, T+10, T+15.....). Ont été mesurés le nombre total de spermatozoïdes mobiles, le nombre de spermatozoïdes dans les sous-populations à mobilité rapide ( $>50 \mu\text{m}/\text{sec}$ ) et à mobilité modérée ( $<50 \mu\text{m}/\text{sec}$ ) à l'aide de l'analyseur de semence HTM 2030 avec une cellule de Makler thermostatée à 37°C (Amann et coll., 1988). Les demi-vies des populations totales mobiles (TL50) ont été déterminées d'après la courbe de survie dans les différents échantillons, ramenée à 100% à T0.

## Résultats

La figure I montre les courbes de survie à 37°C de deux échantillons de sperme d'un même éjaculat dilué après partage dans les dilueurs I et II. Les 2 échantillons de sperme présentent à T0 -D0 les mêmes caractéristiques (nombre de spermatozoïdes mobiles répartition des spermatozoïdes mobiles en sous-populations). La figure II montre que ces caractéristiques restent pratiquement constantes au temps T0, après vieillissement à 4°C pendant 24h (T0 - D1). Après 48h (T0 - D2) il y a une diminution d'environ 10-20% du nombre de spermatozoïdes mobiles.

Dans les deux dilueurs, la mesure de l'évolution du nombre de spermatozoïdes mobiles à 37°C fait apparaître des différences importantes entre le sperme frais et les aliquots des échantillons de sperme conservé à 4°C (fig. I). La population de spermatozoïdes mobiles exprimée en % de la population mobile de départ, décroît d'autant plus vite à 37°C que le sperme a été conservé plus longtemps à 4°C.

### *Comparaison des deux dilueurs*

Nous proposons de définir le temps de demi-vie de la population de spermatozoïdes mobiles

(TL50) comme la durée après laquelle le nombre de spermatozoïdes mobiles est égal à 50% du nombre de spermatozoïdes mobiles à T0. La durée de vie ou temps létal (TL) peut être définie comme la durée après laquelle il n'y a plus de spermatozoïdes mobiles. Nos résultats (fig. I) montrent que quelque soit le dilueur, le temps de demi-vie et le temps létal étaient raccourcis de façon notable par la conservation à 4°C mais que l'évolution des populations et des sous-classes de spermatozoïdes a été différente suivant le dilueur.

*Dilueur I* : A D0, D1, D2, les temps de survie étaient respectivement de 80, 55 et 45 min. Les demi-vies étaient de 63, 23 et 16 minutes.

*Dilueur II* : A D0, D1, D2, les temps de survie étaient respectivement de 70, 65 et 55 min. Les demi-vies étaient de 55, 48 et 35 minutes.

Les figures III et IV montrent respectivement les évolutions comparées des TL et des TL 50 au cours de la conservation dans les deux dilueurs.

## Discussion

Le pouvoir fécondant d'un sperme est lié au degré de motilité des spermatozoïdes et à leur capacité de survie. L'observation microscopique ponctuelle ne permet d'apprécier que le nombre de spermatozoïdes mobiles dans un échantillon et donne peu d'éléments, uniquement subjectifs, sur leur degré de motilité. L'utilisation d'un analyseur de semence permet l'observation de l'évolution de cette motilité et donc de mettre en évidence la capacité de survie d'un échantillon de sperme. Il permet en plus une appréciation objective chiffrée du degré de motilité par définition et comptage de sous-classes de spermatozoïdes définis en fonction de leur vitesse de déplacement.

L'évolution du nombre de spermatozoïdes mobiles et de leur répartition en sous-classes nous a ainsi permis de montrer que le sperme conservé à 4°C en dilueur pouvait subir avec le temps, dans certaines conditions, une altération importante qu'une observation microscopique isolée ne permettait pas de diagnostiquer. Alors que l'évolution estimée par les mesures à T0 paraissait être la même dans les deux dilueurs et ne pas présenter, au bout de 48 h de conservation, de

différence importante avec le sperme frais, la détermination du temps létal montre que les capacités de survie étaient considérablement diminuées : après conservation pendant 48h à 4°C (D2), le nombre de spermatozoïdes mobiles à T0 ne diffère que de 10 % entre les deux dilueurs, la différence entre les TL est de 20% et celle entre les TL50 de 50%.

La comparaison des TL50 à 37°C a donc permis de mettre en évidence une importante différence entre les deux dilueurs et la supériorité du DL II en terme de survie des spermatozoïdes à 37°C après conservation à 4°C.

Nous avons proposé l'utilisation de deux indices de survie. La détermination de la durée létale impose une durée d'examen plus longue que celle de la demi-vie et sa valeur est d'appréciation plus difficile. Au fur et mesure que la population se réduit chaque analyse devient plus longue si on veut conserver le même seuil de spermatozoïdes mobiles (200) par analyse, et effectuée toutes les 5 min., elle perd en précision. La demi-vie à 37°C nous semble un paramètre potentiellement intéressant pour l'évaluation d'un échantillon de sperme et donc également pour la comparaison de dilueurs ou de conditions de conservation. Il reste à préciser les conditions d'utilisation d'un tel indice, à le valider statistiquement et à confronter ses indications au pouvoir fécondant *in vivo* du sperme. Nishikawa avait en 1975 signalé que le pouvoir fécondant du sperme de cheval chutait considérablement après conservation de 1 à 2 jours à 4°C.

*Nous remercions IMV (Laigle France) qui a mis l'analyseur Hamilton-Thorn HTM 2000 à notre disposition.*

## REFERENCES

AMANN, R.P., SQUIRES, E.L. & PICKETT, B.W. (1988). Effects of sample thickness and temperature on spermatozoal motion. 11th. International Congress Animal Reproduction and Artificial Insemination, Dublin, June 1988.

GURAYA, S.S.(1987). Biology of spermatogenesis and spermatozoa in mammals. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 1987.

MANN, T. (1975). In: Hamilton, D.W., Greep, R.O. (Eds). Handbook of Physiology, Sect 7: Endocrinology, vol V. Am Physiol Soc, Washington DC, 461-472.

NELSON, L. (1985). In: Metz, C.B., Monroy, A. (Eds). Biology of Fertilisation, vol II. Academic Press, London New York, 215-234.

NISHIKAWA, Y.(1975). Studies on the preservation of raw and frozen horse semen. J. Reprod. Fert. (Suppl. 23), 99-104.

PALMER, E., (1978) avec la collaboration technique de Domerg, D., Fauquenot, A., & de Sainte-Marie. L'insémination artificielle des juments : bilan de cinq années de recherches et d'utilisation pratique. In : Le cheval : reproduction, sélection, alimentation, exploitation. Exposés présentés aux XIIIe journées du Grenier de Theix, 25-26-27 novembre 1981. Centre de recherches zootechniques et vétérinaires de Theix. Ouvrage collectif / coord. par Jarrige, R. et Martin-Rosset, W., Paris : Institut National de la Recherche Agronomique, cop. 1984, p.141, annexe 2.

SILBERZAHN P., BLANCHARD J., GUINTARD C. (1989) . An in vitro test for the evaluation of sperm. International Congress of Andrology, Florence-Italie.

## LEGENDES DES FIGURES

**Fig. I:** % de spermatozoïdes mobiles en fonction du temps à 37°C dans deux aliquots d'un même éjaculat, dans deux dilueurs différents DL I et DL II. Les spermatozoïdes ont été conservés à 4°C pendant 0 (D0), 1 (D1), et 2 jours (D2).

**Fig. II:** % de spermatozoïdes mobiles dans la population totale à T0 dans deux aliquots d'un même éjaculat, conservés à 4°C dans deux dilueurs différents DLI et DLII pendant 0 (D0), 1 (D1), et 2 jours (D2).

**Fig. III:** Temps létal (TL) : durée à 37°C après laquelle il n'y a plus de spermatozoïdes mobiles. Les spermatozoïdes ont été conservés à 4°C pendant 0 (D0), 1 (D1) et 2 jours (D2).

**Fig. IV:** Demi-vie de la population mobile (TL 50): durée à 37°C après laquelle le nombre de spermatozoïdes mobiles est égal à 50% du nombre à T0. Les spermatozoïdes ont été conservés à 4°C pendant 0 (D0), 1 (D1), et 2 jours (D2).

## LEGENDS OF FIGURES

Fig. I Motile spermatozoa (%) as a function of time at 37°C, in two parts of a same ejaculate, in two different semen extender DLI and DLII.

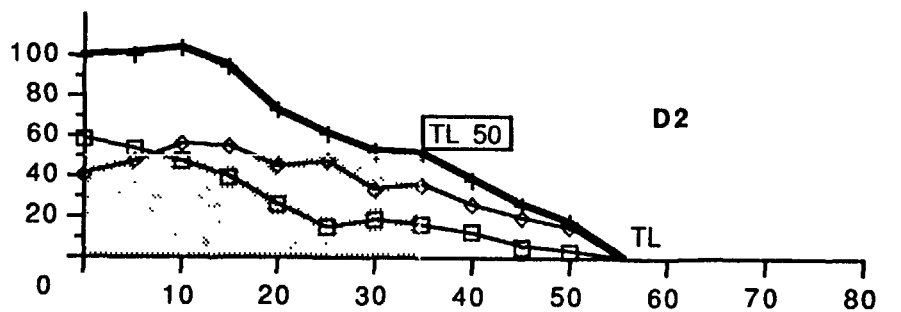
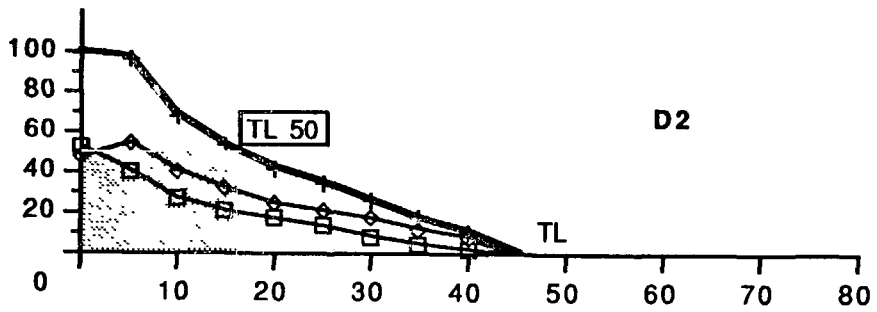
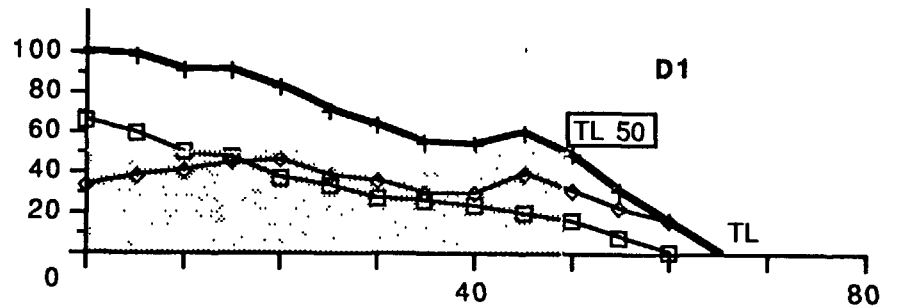
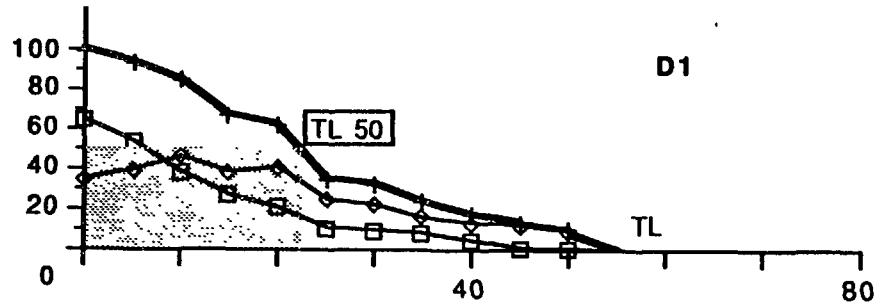
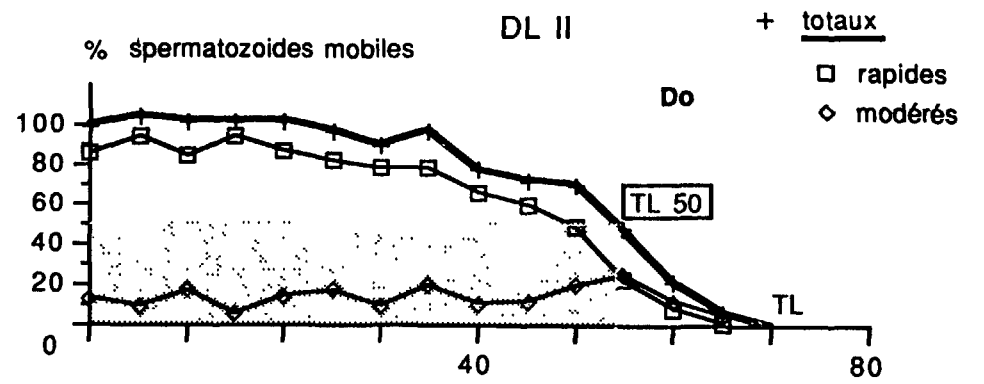
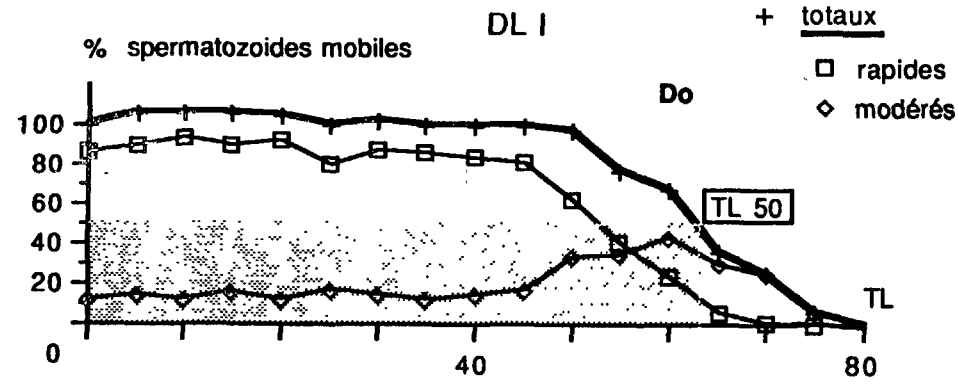
Fig. II Motile spermatozoa (%) in total population at T0 in two parts of a same ejaculate, stored at 4°C in two different semen extenders, stored at 4°C during 0 (D0), 1 (D1), and 2 (D2) days.

Fig. III Letal time (TL) : duration at 37°C after which all spermatozoa had lost their motility.

Fig. IV Half-life of the motile population (TL50) : duration at 37°C after which the number of spermatozoa declined to 50% of the T0 number. Spermatozoa were stored at 4°C during 0 (D0), 1 (D1), and 2 (D2) days.



FIGURE I



Temps (min.)

Temps (min.)

FIGURE II

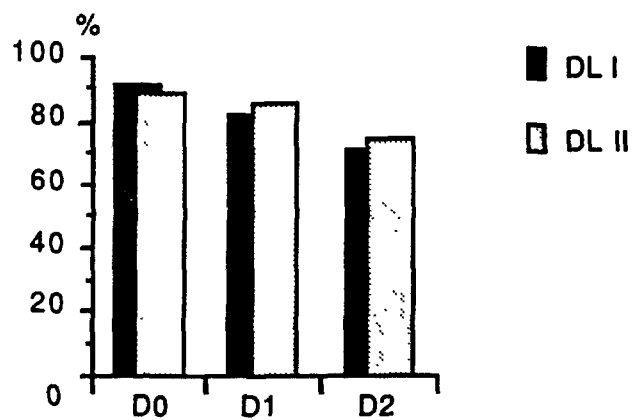


FIGURE III

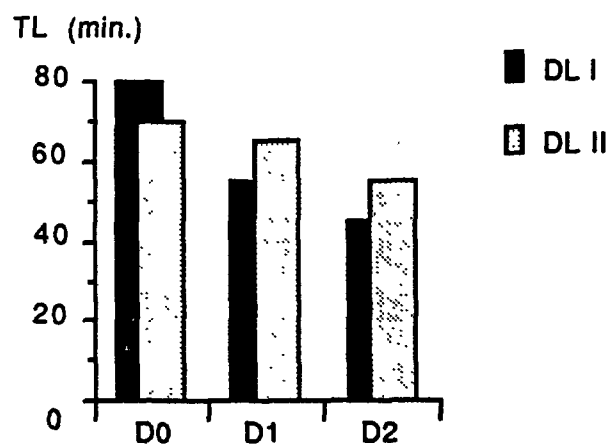


FIGURE IV

