



Influence de la dilution post-décongélation du glycérol sur la mobilité et la fertilité du sperme du Baudet du Poitou

Par TRIMECHE A.¹, RENARD P.² ET TAINURIER D.¹

¹Laboratoire de pathologie de la reproduction
ENV, BP 40706, 44307 Nantes cedex 03

²Groupe de recherche appliquée
à la fertilité, CHR, 35000 Rennes

Résumé

L'étude du mouvement des spermatozoïdes (semence) de baudet du Poitou après congélation dans le milieu T2-94 a montré une amélioration significative des mobilités totales et progressives, ainsi que des vitesses (VCL et VSL) lorsque le cryoprotecteur - le glycérol - était dilué après la décongélation. Par ailleurs, l'étude de la fertilité post-décongélation des semences a montré un taux de fécondation significativement plus élevé lorsque le glycérol était dilué avant l'insémination artificielle (IA) : huit gestations sur 13 baudettes inséminées avec dilution contre zéro gestation avec la méthode sans dilution. Notons que trois naissances sur les 8 gestations ont été obtenues avec ce procédé de congélation et de dilution du glycérol avant l'IA.

Mots clés : baudet du Poitou - sperme - congélation - dilution - analyseur d'images ATS-M - fertilité.

Summary

The study of Poitou jackass spermatozoa movement characteristics after thawing in T2-94 medium has shown a significant improvement of total and progressive motilities, thus velocities (VCL and VSL) when cryoprotectant - the glycerol - has been diluted after dilution. On the other hand, the study of post-thaw fertility semen has shown a more significant pregnancy rate when the glycerol has been diluted before artificial insemination (AI). Eight pregnancies have been obtained among 13 Poitou jennies inseminated with dilution. Zero pregnancy has been obtained without dilution. Especially, three births among the eight pregnancies have been obtained using the glycerol dilution procedure before AI.

Key-words : Poitou jackass - semen - freezing - dilution - computer analysis system ATS-M - fertility.

I - INTRODUCTION

La majorité des cryoprotecteurs utilisés sont des composés chimiques vis-à-vis desquels les membranes cellulaires sont perméables (ainsi appelés "cryoprotecteurs perméables"). Deux étapes dans leur utilisation sont importantes : 1) leur addition aux cellules avant la congélation et 2) leur retrait des cellules après la décongélation. Dans le premier cas, lorsque la cellule est placée dans un milieu hyperosmotique en ce qui concerne les cryoprotecteurs perméables comme le glycérol mais isotonique concernant les sels imperméables, elle commence par se contracter sous l'effet de l'afflux de l'eau intracellulaire, puis elle recouvre son volume initial au fur et à mesure que le glycérol pénètre et que l'eau réintègre de manière concomitante la cellule. Dans le second cas, lorsque la cellule avec une forte concentration intracellulaire en glycérol est exposée à une solution isotonique, elle commence par gonfler à cause de l'influx osmotique de l'eau extracellulaire, puis son volume décroît alors que le glycérol diffuse à l'extérieur en même temps que l'eau. C'est au cours de ces différents chocs osmotiques que peuvent se produire des lésions des cellules (Crister *et al.*, 1988 ; Gao *et al.*, 1993). Dans de récents travaux, Gao *et al.* (1995) ont montré que les spermatozoïdes humains sont plus sensibles à l'augmentation du volume cellulaire occasionnée par un choc hypoosmotique que par la contraction due à un stress hyperosmotique. Dans une autre étude, Renard et Le Lannou (résultats non publiés) ont constaté qu'un retrait en 8 étapes du glycérol à molarité fixe du sperme humain décongelé améliorerait significativement le nombre de spermatozoïdes pouvant pénétrer la glaire cervicale ainsi que le degré de pénétration.

Au cours de nos précédents travaux (Trimeche *et al.*, 1996a ; Trimeche *et al.*, 1996b ; Trimeche, 1996), nous avons progressivement mis au point une méthode de cryoconservation du sperme de baudet du Poitou nous permettant d'obtenir après décongélation jusqu'à environ 50% de spermatozoïdes mobiles et ne présentant aucune lésion de leur acrosome ni de leur noyau ou de leur membrane plasmique. Malgré ces très bon résultats, aucune gestation de baudette avec sperme congelé ne venait, pourtant, récompenser nos efforts et nos espoirs. Dans cette étude, nous rapportons le pas décisif dans la réussite de notre projet que furent nos études sur l'influence de la dilution du glycérol de la semence décongelée avant l'insémination artificielle.

II - MATERIEL ET METHODES

A - Recueil et dilution des semences

Les éjaculats ont été prélevés à l'aide d'un vagin artificiel tous les 2 jours, entre les mois de janvier et mars, chez 4 baudets du Poitou âgés de 4 à 7 ans confiés à l'Ecole nationale vétérinaire de Nantes. Après avoir été filtrée, la semence a été analysée pour déterminer sa concentration et sa mobilité initiale. Elle a ensuite été diluée dans un tube en plastique de 30 ml à raison de 60×10^6 spermatozoïdes/ml dans le milieu de congélation T2-94 maintenu à 34°C (Trimeche, 1996).

B - Congélation-décongélation des semences

Le mélange sperme T2-94 a d'abord été refroidi de 34°C à 4°C à raison de 0,5°C/mn dans une machine programmable (Huber PD 410 ; Huber, Offenburg, Allemagne). Il a ensuite été transféré dans des paillettes de 0,5 ml puis ces dernières ont été congelées pendant 10 mn dans les vapeurs d'azote liquide (LN₂), en les disposant horizontalement à -96°C. Elles sont ensuite été immergées dans LN₂ (-196°C) pour y être stockées. La décongélation a été effectuée en plaçant les paillettes dans un bain-marie à 37°C pendant 30 sec.

C - Dilution des semences après la décongélation

Immédiatement après la décongélation, le contenu des paillettes a été versé dans des tubes plastiques pour progressivement y être mélangé ou non (témoin) à un volume égal de milieu T2-94 dépourvu de glycérol. Si elles n'ont pas été aussitôt utilisées en insémination artificielle (IA), les semences ont été conservées dans un bain-marie à 37°C pendant 5 heures afin de suivre l'évolution de leur mobilité (T10 min - T70 min - T130 min - T190 min - T250 min - T310 min).

D - Estimation de la mobilité

La mobilité spermatique a été estimée grâce à l'analyseur d'images ATS-M (J.C. Diffusion, La Ferté-Fresnel, France) en utilisant une chambre de Makler (Trimeche, 1996 ; Trimeche et al., 1996a). 100 à 150 spermatozoïdes ont été enregistrés afin de déterminer les mobilités totales (nombre de spermatozoïdes mobiles) et progressives (nombre de spermatozoïdes avec un mouvement progressif ondulant / nombre de spermatozoïdes mobiles x 100) ainsi que les caractéristiques de mouvement suivantes : vitesse curvilinéaire (VCL, $\mu\text{m/s}$), vitesse progressive (VSL, $\mu\text{m/s}$) et amplitude latérale de la tête (ALH, μm).

E - Estimation de la fertilité des semences

La fertilité des semences a été estimée en réalisant des IA. Seules les semences présentant une mobilité totale après la décongélation d'au moins 35% ont été employées. Les IA ont été effectuées avec des doses de 600×10^6 spermatozoïdes, soit le contenu de 20 paillettes (pour un volume de 20 ml dans le cas des semences diluées après décongélation et de 10 ml pour celles non diluées).

Treize boudettes croisées baudet du Poitou, suitées, nullipares ou ayant mis bas une fois au moins, âgées de 3 à 10 ans et confiées à l'École nationale vétérinaire de Nantes ont été utilisées pour ces IA avec semences cryopréservées. Les IA ont eu lieu à partir du moment où les animaux ont présenté les signes d'oestrus et que la taille du follicule dominant à l'échographie était supérieure à 30 mm (Trimeche et Tainturier, 1995). Elles se sont succédées jusqu'à l'ovulation au rythme d'une par jour.

Afin de réduire l'effet femelle, les boudettes ont été réparties au hasard en 2 groupes de 6 et 7 individus et tous les individus d'un même groupe ont été inséminés en alternance à chaque cycle avec de la semence diluée ou du sperme non dilué, et ce sur un maximum de 4 cycles. Toutes femelles dépistées gestantes à la fin d'un cycle ont été retirées du protocole.

Le diagnostic de gestation a été effectué au 14^{ème} jour (J14) après l'ovulation et confirmé au 16^{ème} jour (J16) par échographie. Si à J16 la femelle a été diagnostiquée non gestante, une injection de prostaglandine F2 α (Estrumate ND ; Pitman-Moore, Meaux, France), à la dose de 0,5 $\mu\text{g/kg}$, lui a été administrée.

F - Analyse statistique

Les résultats de mobilité ont été exprimés par les moyennes \pm l'erreur standard (s.d.). L'analyse statistique a été réalisée à l'aide de l'analyse de variance à mesure répétée sur le logiciel Statview IV (Abacus Concepts, USA). Les valeurs de mobilité enregistrées au cours du temps ont été comparées à l'aide du test de Scheffé. En revanche, la comparaison des données aux mêmes temps a été effectuée grâce au test *t* de Student en séries appariées. Les résultats d'IA ont été analysés à l'aide du test de χ^2 . Dans tous les cas, des valeurs de $P < 0,05$ ont été prises comme statistiquement significatives.

III - RESULTATS

A - Effet de la dilution du glycérol après la décongélation sur la mobilité et les caractéristiques de mouvement des semences

Comme le montre le Tableau 1, les mobilités totales et progressives ainsi que les caractéristiques de mouvement (à l'exception de l'ALH) des semences après la décongélation ont diminué significativement et progressivement au cours du temps, et ce aussi bien dans le sperme dilué que dans celui non dilué. En revanche, la réduction des valeurs de ces mêmes paramètres est apparue plus lente chez les semences diluées que chez les semences non diluées. Dès 1h après la dilution (t 70 min), les mobilités totales et progressives des spermatozoïdes dilués se sont révélées significativement supérieures à celles des spermatozoïdes non dilués. Dans le même temps, VCL et VSL sont apparues significativement supérieures dans les semences diluées que dans celles non diluées. Ces résultats ont suggéré que le glycérol exerçait un effet toxique sur des semences conservées à 37°C et que son retrait, même partiel, était bénéfique à la survie de ces spermatozoïdes.

B - Effet de la dilution du glycérol après la décongélation sur la fertilité des semences

Le Tableau 2 donne les résultats de gestation des boudettes inséminées avec de la semence décongelée diluée ou non diluée. Aucune gestation n'a été constatée lorsque les boudettes ont été inséminées avec de la semence non diluée. En revanche, l'emploi en IA de semence diluée a permis d'obtenir 8 gestations.

IV - DISCUSSION

Nos résultats montrent que non seulement les mobilités (totales et progressives) et les vitesses (VCL et VSL) de la semence de boudet du Poitou sont améliorées lors d'une incubation post-décongélation de 5h à 37°C lorsque le glycérol est partiellement retiré du milieu de dilution (Tableau 1), mais surtout qu'une semence débarrassée, même partiellement, du glycérol toxique est capable de féconder des boudettes (Tableau 2). Ils révèlent, en outre, que la cryopréservation d'une semence ne se limite pas à la seule congélation-décongélation mais qu'elle implique d'apporter une attention toute particulière à la manipulation post-décongélation du sperme et à la méthode d'insémination.

L'influence de la dilution du sperme après décongélation a été plusieurs fois rapportée. C'est ainsi que chez le ver, des dilueurs « dits » de décongélation ont été mis au point pour l'utilisation en IA de spermatozoïdes cryopréservés : le BTS (Pursel et Johnson, 1975), le D8 d'Hülseberg (Westendorf et al., 1975), l'INRA-ITP (Paquignon et Courot, 1976), l'OLEP (Larson et Einarson, 1976). Ce sont des composés glucosés riches en électrolytes. Il semble que le BTS permette d'obtenir les meilleurs pourcentages de spermatozoïdes mobiles et à acrosomes normaux, mais que le taux de gestation et la survie embryonnaire soient significativement plus élevés avec le milieu INRA-ITP (Paquignon, 1985).

Nous ne pouvons affirmer avec certitude les raisons de l'amélioration des performances de mobilité et de fécondance des spermatozoïdes observés dans cette étude. Il semble, néanmoins, probable que la réduction de la concentration en glycérol toxique dans le milieu de dilution des spermatozoïdes ait une influence bénéfique sur la survie de cellules à 37°C. Dans notre étude, la dilution post-décongélation fait ainsi baisser de moitié la concentration initiale en glycérol. D'autre part, lors de l'IA, les semences décongelées passent brutalement d'un milieu à très forte pression osmotique à l'osmolarité physiologique d'environ 300 mOsm du liquide utérin de la boudette. Gao et al. (1995) ont montré qu'un tel choc osmotique provoquait une baisse irréversible de la mobilité totale et une perte de l'intégrité membranaire

Tableau 1

Effet de la dilution du glycérol après la décongélation sur la mobilité et les caractéristiques de mouvement des semences de baudet du Poitou conservées à 37°C pendant 5 h (n = 32)[§].

	SEMENCES NON DILUEES (TEMOIN)					SEMENCES DILUEES				
	MOBILITE TOTALE %	MOBILITE PROGRESSIVE %	VCL $\mu\text{m/s}$	VSL $\mu\text{m/s}$	ALH μm	MOBILITE TOTALE %	MOBILITE PROGRESSIVE %	VCL $\mu\text{m/s}$	VSL $\mu\text{m/s}$	ALH μm
T10 min	37.3 ± 5.9	62.0 ± 10.1	59.5 ± 6.7	52.6 ± 6.8	2.0 ± 0.2	44,6 ± 6,8*	72,0 ± 7,5*	65,6 ± 7,5*	56,1 ± 8,6*	2,0 ± 0,5
T70 min	27.9 ± 7.6	54,5 ± 11,1	52,6 ± 5,7	46,2 ± 6,2	1,9 ± 0,2	37,5 ± 7,4*	64,9 ± 6,1*	58,9 ± 5,7*	50,1 ± 5,9*	1,8 ± 0,2
T130 min	22.4 ± 6.3	47.2 ± 10.4	48,2 ± 6,1	40,2 ± 7,2	1,9 ± 0,1	31,8 ± 7,3*	58,2 ± 6,3*	55,8 ± 6,7*	47,1 ± 7,0*	2,0 ± 0,2
T190 min	16.0 ± 5.2	40.5 ± 8.4	42,9 ± 6,1	34,8 ± 7,1	2,0 ± 0,3	26,7 ± 6,7*	51,9 ± 6,7*	51,9 ± 6,8*	43,3 ± 7,1*	1,9 ± 0,2
T250 min	11,6 ± 4,1	34,7 ± 7,2	38,2 ± 6,8	30,1 ± 6,3	2,1 ± 0,4	21,3 ± 5,2*	44,3 ± 6,6*	47,5 ± 6,8*	38,7 ± 7,4*	1,9 ± 0,2
T310 min	9.2 ± 3.2	27,5 ± 8,5	33,6 ± 5,6	25,1 ± 5,2	2,0 ± 0,1	16,1 ± 3,4*	37,2 ± 6,4*	41,6 ± 7,7*	33,8 ± 7,8*	2,0 ± 0,3

[§] Les valeurs représentent les moyennes ± s.d.

Les valeurs affectées du sigle * diffèrent significativement (P<0,05) de la valeur témoin au même temps.

Tableau 2

Résultats de gestation des baudettes inséminées avec de la semence congelée-décongelée, diluée ou non diluée (n = 13)[§].

	IA AVEC SEMENCE NON DILUEE (TEMOIN)	IA AVEC SEMENCE DILUEE
PROPORTION DE FEMELLES GESTANTES APRES LE PREMIER CYCLE (%)	0/6 (0)	2/7 (29)*
PROPORTION DE FEMELLES GESTANTES APRES LE DEUXIEME CYCLE (%)	0/5 (0)	3/6 (50)*
PROPORTION DE FEMELLES GESTANTES APRES LE TROISIEME CYCLE (%)	0/3 (0)	2/5 (40)*
PROPORTION DE FEMELLES GESTANTES APRES LE QUATRIEME CYCLE (%)	0/3 (0)	1/3 (34)*

[§] Les baudettes ont été réparties au hasard en 2 groupes de 6 et 7 individus et tous les individus d'un même groupe ont été inséminés en alternance à chaque cycle avec de la semence diluée ou non diluée, et ce sur un maximum de 4 cycles. Toutes femelles dépistées gestantes à la fin d'un cycle ont été retirées du protocole.

Les valeurs affectées du sigle * diffèrent significativement (P<0,05) de la valeur témoin au même cycle.

des spermatozoïdes humains non-cryopréservés. Plus récemment, Renard et Le Lannou (résultats non publiés) ont constaté que la mobilité totale post-décongélation de spermatozoïdes humains dilués dans un milieu à 300 mOsm, le nombre de spermatozoïdes décongelés pénétrant la glaire cervicale de femmes ovulantes et le degré de pénétration de ces glaires étaient significativement améliorés lorsque le choc osmotique causé par la dilution était limité par une diminution progressive de la pression osmotique du milieu. Nos bons résultats pourraient également avoir pour influence un passage progressif des spermatozoïdes d'un milieu hyperosmotique à l'isoosmolarité.

Dans cette étude, nous avons effectué une sélection sévère des femelles destinées à être inséminées (voir matériel et méthodes) et l'influence de cette sélection sur nos taux de gestation ne peut être écartée. Chez le cheval, le facteur femelle influence beaucoup plus fortement la fertilité que le facteur mâle, la fertilité est également différente que les juments soient nullipares, vides ou suitées mais surtout, elle varie au cours des cycles successifs (Vidament et al., 1993).

V - CONCLUSION

La dilution (v/v) de la semence décongelée de baudet du Poitou dans un milieu T2-94 dépourvu de glycérol permet d'améliorer significativement les mobilités totales et progressives et les vitesses spermatozoïdaires au cours d'une conservation de 5 h à 37°C. Surtout, cette dilution permet la fécondation de baudettes suitées, nullipares ou ayant mis bas au moins une fois. En octobre 1995, Hermine, Henry et Hannibal sont devenus les premiers baudets du Poitou issus de ce procédé de congélation et de dilution de la semence avant l'IA.

VI - REFERENCES

- Critser J.H., Huse-Benda A.R., Aaker D.V., Arneson B.W. et Ball G.D. (1988) Cryopreservation of human spermatozoa. III The effect of cryoprotectants on motility. *Fertil. Steril.* **50**, 314-320.
- Gao D., Liu J., McGann L., Watson P.F., Kleinhans F.W., Mazur P., Critser E.S. et Critser K. (1995) Prevention of osmotic injury of human spermatozoa during addition and removal of glycerol. *Hum. Reprod.* **10**, 1109-1122.
- Gao D., Mark L., McGann L., Liu J., Kleinhans W., Mazur P. et Critser K. (1993) Prevention of osmotic injury of human spermatozoa during addition and removal of cryoprotective agents (CPA) : modeling and optimization. *Cryobiology* **30**, abstract 117.
- Larson K. et Einarson S. (1976). Fertility of deep-frozen boar spermatozoa. Influence of thawing diluents of boars. *Acta Vet. Scand.* **17**, 43-62.
- Paquignon M. (1985). Freezing and thawing extenders for boar's spermatozoa : proceeding of the first international conference on deep freezing of boar semen. August 25-27, Uppsala, 129-145.
- Paquignon M. et Courot M., (1976). Fertilizing capacity of frozen boar spermatozoa. VIII th Int. Cong. Anim. Reprod. A.I., Cracow IV, 1041-1044.
- Pursel V.G. and Johnson L.A. (1975). Freezing of boar spermatozoa. Fertilizing capacity with concentrated semen and a new thawing procedure. *J. Anim. Sci.* **40**, 99-102.

Trimeche A. et Tainturier D. (1995). Etude échographique de la cinétique folliculaire de la baudette du Poitou au cours de l'été et du printemps. *Révue de Médecine Vétérinaire* **146**, 11, 743-748.

Trimeche A. (1996). Etudes sur la fertilité et la cryopréservation du sperme du baudet du Poitou. Thèse d'Université de Rennes I.

Trimeche A., Renard P., Le Lannou D., Barrière P. and Tainturier D. (1996a). Improvement of motility of post-thaw Poitou jackass sperm using glutamine. *Theriogenology* **45**, 1015-1027.

Trimeche A., Anton M., Renard P., Gandemer G. and Tainturier D. (1996b). Quail egg yolk : a novel cryoprotectant for the freeze preservation of Poitou jackass sperm. *Cryobiology* (accepted for publication).

Vidament M., Magistrini M., Couty I. et Palmer E. (1993). La semence congelée d'étalon : données expérimentales et du terrain. 19ème journée Céréopa, Paris, 3 mars.

Westendorf P., Richter L., Treu H. (1975). Zur Tiefgefrierung von Ebersperma : labor und Besamungsergebnisse mit dem Hülsenberger Pailletten Verfahren. *Dtsch Tierärztl. Wschr.* **82**, 261-267.

