

R8703

ETUDE DU NOYAU DES SPERMATOZOÏDES DE VERRAT AVANT ET APRES CONGELATION

HAMAMAH S.(1), PAQUIGNON M.(2), NICOLLE J.C.(1)

(1) I.N.R.A. Station de Physiologie de la Reproduction, Nouzilly 37380 MONNAIE

(2) Institut Technique du Porc, M.N.E. 149, rue de Bercy 75795 PARIS Cedex 12

I - INTRODUCTION

Le spermatozoïde est une cellule complexe qui a des caractéristiques et des fonctions multiples à préserver pour maintenir ses capacités fécondantes : morphologie, motilité, métabolisme, pénétration de l'ovocyte, formation d'un embryon viable. Or, l'altération d'un certain nombre d'entre-elles par la congélation entraîne une chute de la fertilité et de la prolificité (PAQUIGNON, 1984). De nombreuses études basées sur une évaluation de ces altérations a permis de développer des tests de laboratoire devant prévoir avant son utilisation le pouvoir fécondant du sperme (PURSEL *et al.*, 1972 ; CRABO *et al.*, 1972 ; PAVELKO et CRABO, 1976 ; AALBERS *et al.*, 1985). Cependant, si chacun d'entre-eux en donne une bonne indication, aucun ne peut prédire la fertilité avec précision.

Jusqu'à maintenant, aucune étude n'a pris en considération comme test de qualité de la semence, l'altération éventuelle du noyau des spermatozoïdes en relation avec la diminution de leur pouvoir fécondant après congélation. Or, certains travaux concernant le stade de développement de l'oeuf (LWOFF *et al.*, 1987) et la mortalité embryonnaire précoce (SCHWARTZ *et al.*, 1983) après utilisation de la semence congelée peuvent la laisser supposer.

L'objet de ce travail a été de tester cette hypothèse en analysant l'état de l'ADN par la marquage à l'acridine orange et l'état de la structure de la chromatine par la mesure quantitative de l'A.D.N. Feulgen.

II - MATERIEL ET METHODE

1° ETUDE DE L'ADN PAR LE MARQUAGE A L'ACRIDINE ORANGE :

Huit verrats ont été récoltés une fois chacun. Les spermatozoïdes frais ou congelés, issus d'un même éjaculat, ont été lavés trois fois dans un tampon: NaCl 0,15 M ; Citrate de sodium trisodique 0,015 M; pH 7.2.

A la dernière centrifugation (5 mn - 1 300 g), le culot est dilué dans 1 ml du tampon et ajusté à la concentration finale de 50×10^6 spz/ml.

Les spermatozoïdes sont alors étalés sur des lames. La moitié de ces frottis ne subiront aucun traitement (spz témoins), les autres (spz traités) seront soumis à une dénaturation par la chaleur

(chauffage 100°C). Les frottis sont fixés dans une solution de méthanol/acide acétique glacial : 3/1 pendant une nuit à la température ambiante. Puis ils sont colorés pendant 5 mn à l'acridine orange 0,1 % dont 10 ml ont été mélangés avec 40 ml d'acide citrique 0,1 M ainsi que 2,5 ml de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,3 M à pH 2,5 (TEJADA *et al.*, 1984). Après coloration, les frottis sont lavés plusieurs fois dans de l'eau déminéralisée et observés ensuite en microscopie à fluorescence. Les spermatozoïdes ont été comptés sur 5 plages réparties suivant les diagonales du frottis (200 à 500 spz/lame). Les comptages ont été effectués en double.

2° ETUDE CYTOPHOTOMETRIQUE DE LA CHROMATINE APRES COLORATION DE L'A.D.N. PAR LA RÉACTION DE FEULGEN :

Parmi les éjaculats de ces huit verrats, quatre d'entre-eux ont aussi fait l'objet de mesure quantitative de l'ADN-Feulgen de leurs spermatozoïdes (ESNAULT et NICOLLE, 1976) avant et après congélation. Les frottis de spermatozoïdes sont colorés par la réaction de Feulgen après avoir subi une hydrolyse HCl, N à 60 °C pendant 9 mn.

Après coloration, les mesures d'absorption du complexe ADN-Feulgen ont été effectuées en microspectrophotométrie en lumière visible à la longueur d'onde de 560 nm par balayage de chacun des noyaux des spermatozoïdes.

Ainsi pour chaque noyau, nous obtenons :

1° Une valeur (en unité arbitraire) correspondant à la quantité de lumière absorbée par le matériel (ADN-Feulgen) coloré.

2° La surface du noyau mesuré.

Sur chaque frottis (spz frais et congelé), 30 cellules ont été analysées.

III - RESULTATS ET DISCUSSION

1° ETAT DE L'ADN DU NOYAU PAR MARQUAGE A L'ACRIDINE ORANGE (Tableau 1)

Avant traitement, le pourcentage de spermatozoïdes dont le noyau possède un ADN dénaturé ne varie pratiquement pas entre verat et entre les deux modes de préparation de la semence (7,1 %

TABLEAU 1
EFFET DU MODE DE CONDITIONNEMENT DE LA SEMENCE SUR LE POURCENTAGE DE SPERMATOZOÏDES AYANT UN A.D.N. DÉNATURÉ

N° des verrats	Avant traitement		Après traitement (1)	
	Frais	Congelé	Frais	Congelé
1	09	12	38	65
2	09	09	44	48
3	11	14	62	61
4	05	06	56	50
5	07	09	60	43
6	05	17	64	43
7	04	10	38	45
8	07	09	41	37
$\bar{m} \pm \text{s.d.}$	$7,1 \pm 2,4$	$10,7 \pm 3,4$	$50,4 \pm 11,2$	$49,0 \pm 9,5$

(1) Les spermatozoïdes ont été chauffés à + 100.°C.

et 10,7 % respectivement pour le sperme frais et congelé). Chez les spermatozoïdes à l'ADN non dénaturé, la coloration à l'acridine orange provoque une fluorescence verte et homogène au niveau de la tête avec souvent la région postacrosomique plus fluorescente que la région acrosomique. Toutefois, lorsque l'ADN est partiellement dénaturé, une fluorescence jaune ou orange apparaît dans la région de la lame postacrosomique. Quand il est complètement dénaturé, la fluorescence jaune ou orange apparaît au niveau de la région acrosomique et post-acrosomique.

Après traitement par la chaleur, la dénaturation de l'ADN est plus importante mais ne varie pas significativement entre les deux modes de préparation de la semence (50,4 % et 49,0 % respectivement pour le sperme frais et congelé). La tête des spermatozoïdes ayant un A.D.N. dénaturé apparaît complètement orange. Cependant, le flagelle des gamètes reste toujours vert.

2° ETAT DE LA STRUCTURE DE LA CHROMATINE DES SPERMATOZOÏDES (Tableau 2)

Le contenu en ADN-Feulgen diminue significativement après congélation (4,83 contre 4,27 respectivement pour le sperme frais et congelé $P < 0,05$). Il existe cependant une différence entre verrat. En effet, cette diminution n'apparaît que chez les verrats 2, 5 et 8 (7,2 % -14,7 % et 23,0 % respectivement). Pour le verrat 6, il n'y a aucune différence entre sperme frais et congelé. Parmi ces animaux, le verrat n° 2 montre des spermatozoïdes à l'état frais dont la valeur d'ADN-Feulgen (5.4 U.A.) est significativement supérieure à celles des spermatozoïdes des autres verrats (4,7 - 4,7 - 4,4 pour les n° 5, 8 et 6 respectivement). Il faut noter que les spermatozoïdes de ce verrat ont été utilisés dès la récolte, sans dilution, alors que ceux des autres animaux ont été en contact avec un dilueur pendant 6 heures. Ceci semblerait montrer aussi un possible effet du dilueur sur la structure de la chromatine. Si tel est le cas, la non modification de l'ADN-Feulgen entre sperme frais et congelé pour le verrat 6 peut être expliquée par une plus forte sensibilité à la dilution des spermatozoïdes de cet animal. Leur chromatine atteindrait une telle configuration structurale qu'elle ne pourrait plus être modifiée ultérieurement par la congélation.

TABLEAU 2

EFFET DU MODE DE CONDITIONNEMENT DE LA SEMENCE SUR LA TENUEUR EN A.D.N. FEULGEN ET SUR LA SURFACE DES NOYAUX DES SPERMATOZOÏDES

Spermatozoïdes	Mesures	N° Verrat				m
		2	5	6	8	
Frais	ADN-Feulgen (U.A.)	5,4 a	4,7 a	4,4 a	4,7 a	4,8 a
	Surface (μm^2)	31,3 a	31,8 a	31,5 a	30,6 a	31,3 a
	Absorption/surface	0,17	0,15	0,14	0,15	0,15
Congelés	ADN-Feulgen (U.A.)	4,2 b	4,4 b	4,5 a	4,1 b	4,3 b
	Surface (μm^2)	30,2 b	31,4 a	31,2 a	29,2 b	30,5 b
	Absorption/surface	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14

n = 30 : Les valeurs d'une même mesure non suivies verticalement de la même lettre sont significativement différentes ($P < 0,05$).

Il semble donc que sous l'effet de la dilution et de la congélation, la chromatine du noyau subisse une ou des modification(s) se traduisant par un masquage accru ou une disparition des sites de fixation du colorant sur l'ADN.

La congélation entraîne également une diminution significative de la surface des noyaux (31,3 contre 30,5 respectivement pour le sperme frais et congelé). Une différence entre verrat apparaît également. Deux d'entre-eux ont une diminution significative de cette surface (-3,5 % et -4,6 % respectivement pour les verrats 2 et 8). Chez les deux autres, aucune différence n'est observée.

CONCLUSION

Le marquage à l'acridine orange n'a pas révélé un effet significatif de la congélation sur l'A.D.N. du noyau des spermatozoïdes de verrat. Dans l'état actuel il ne peut donc pas être utilisé comme indicateur d'un effet de la congélation sur la qualité de la semence. Cependant, l'analyse quantitative de l'ADN-Feulgen met en évidence un effet de la congélation sur l'état structural de la chromatine et de plus elle suggère un effet dû à la dilution. Cette dernière étude mériterait d'être poursuivie pour tester avec plus de précision l'effet du dilueur dont le rôle est essentiel dans la conservation des spermatozoïdes et celui de la congélation.

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé à l'aide d'un contrat "Cryobiologie" (Code I.N.R.A. 1247 A). Nous tenons à remercier Mr E. PALMER impliqué avec nous dans ce contrat.

BIBLIOGRAPHIE

- AALBERS J.G., JOHNSON L.A., AALBERS-SMIT E.A., RADEMAKER J.H.M., 1985. First. Int. Conf. Deep Freezing Boar Semen, Uppsala, 259-264.
- CRABO B.G., BROWN K.I., GRAHAM E.F., 1972. J. Anim. Sci. **35**, 377-382.
- ESNAULT C., NICOLLE J.C., 1976. Ann. Histochem. **21**, 189-197.
- LWOFF L., BEZARD J., PAQUIGNON M., 1987. Journées Rech. Porcine en France, **19**, 79-86.
- PAQUIGNON M., 1984. Curr. Top. Vet. Med. Anim. Sci. **30**, 202-218.
- PAVELKO M.K., CRABO B.G., 1976. Proc. VIIIth Int. Congr. Anim. Reprod. A.I., Krakow **4**, 1045-1048.
- PURSEL V.G., JOHNSON L.A., SCHULMAN L.L., 1972. VIIth Int. Congr. Anim. Reprod. A.I. Munich, II, 1595-1600.
- SCHWARTZ D., HEUCHEL V., MAYAUX M.J., O'QUIGLEY J., 1983. Gamete Research **8**, 371-377.
- TEJADA R.J., MITCHELL J.C., NORMAN A., MARIK J.J., FRIEDMAN S., 1984. Fertility and Sterility **42**, 87-91.