

ETUDE COMPAREE DES CARACTERISTIQUES DU SPERME ET DU CHONDRIOME DES SPERMATOZOIDES CHEZ LES COQS DES LIGNEES R+ ET R- SELECTIONNEES DE FAÇON DIVERGENTE SUR LA CONSOMMATION ALIMENTAIRE RESIDUELLE

Morisson Mireille¹, Bordas André¹, Petit Jean-Michel², Jayat-Vignoles Chantal², Julien Raymond² et Minvielle Francis¹

¹ INRA, Laboratoire de Génétique Factorielle, 78352 Jouy-en-Josas

² Université de Limoges, Institut de Biotechnologie, 87060 Limoges

Résumé

Deux lignées de poules pondeuses ont été sélectionnées de façon divergente pour leur efficacité alimentaire. Des réponses associées à la sélection sont apparues affectant la fertilité et la viabilité embryonnaire. Lors de cette étude, nous avons comparé les spermes de 9 coqs R- (à faible consommation résiduelle) et de 10 coqs R+ (à forte consommation résiduelle). Nous avons mesuré le volume et la concentration en spermatozoïdes des éjaculats, étudié certaines caractéristiques biochimiques du plasma séminal et estimé la motilité massale des spermatozoïdes. Nous avons également analysé l'activité mitochondriale des spermatozoïdes et l'importance de leur chondriome. Les données recueillies suggèrent que l'activité mitochondriale des spermatozoïdes est comparable dans les deux lignées mais que l'importance du chondriome est 17% plus faible chez les coqs R+ comparativement aux coqs R-. Cette donnée explique certainement la plus faible motilité des spermatozoïdes des coqs R+ et le faible taux d'éclosion noté dans cette lignée.

Abstract

Associated effects of divergent selection for residual feed consumption on reproduction, sperm characteristics and chondriome of spermatozoa

Eighteen generations of divergent selection for residual feed intake have been completed in two Rhode Island Red lines of domestic fowl. The high intake R+ line and the low intake R- line cocks used to sire generation 19 of the selection experiment have been compared for associated responses on fertility, hatching and sperm quality. Evaluations of sperm samples were based on volume, cell concentration, biochemical parameters and on motility and morphology of spermatozoa. Individual spermatozoa were analysed by flow-cytometry to assess overall mitochondrial activity and overall mitochondrial content. Our results suggest that, in the R+ line, the poor performance at fertilization and during early embryonic development was associated with lower production of motile spermatozoa, possibly in relation to a lower quantity of mitochondria in spermatozoa from R+ cocks. These results suggest that selection for residual feed intake may have altered some cellular function related to the production of energy in the R+ line.

Introduction

Dans le but d'augmenter le rendement de la production d'oeufs en diminuant la prise alimentaire, deux lignées de poules pondeuses ont été sélectionnées de façon divergente pour leur efficacité alimentaire à partir d'une population Rhode Island Red à oeufs bruns. Les deux lignées, l'une à forte consommation résiduelle notée R+ et l'autre à faible consommation résiduelle notée R-, sont sélectionnées depuis 1976 (Bordas et Mérat, 1984 ; Bordas *et al.*, 1992).

En plus de la réponse directe à la sélection, d'autres sont apparues affectant la fertilité et la viabilité embryonnaire (Bordas et Mérat, 1993).

De façon à élucider les raisons de la baisse d'éclosion chez les animaux R+, nous avons étudié le sperme de 9 coqs de la lignée R- et 10 coqs de la lignée R+ en comparant, entre les deux lignées, le

volume de l'éjaculat, la concentration en spermatozoïdes (spz), leur motilité et leur morphologie. Nous avons également noté le pH et les concentrations en acide urique et en protéines du plasma séminal et nous avons analysé l'activité mitochondriale des spermatozoïdes et l'importance de leur chondriome. En effet, la motilité des spermatozoïdes dépend de l'activité mitochondriale fournissant l'énergie nécessaire au mouvement flagellaire (Auger *et al.*, 1989 ; Folger *et al.*, 1993). La masse membranaire mitochondriale peut être évaluée indirectement en utilisant la 10-N-nonyl acrydine orange ou NAO (Maftah *et al.*, 1989 ; Petit *et al.*, 1992 ; 1995) alors que la Rhodamine 123 ou Rh123 permet l'analyse *in situ* de l'activité mitochondriale sur cellules intactes (Darzynkiewicz *et al.*, 1981 ; Nadakavukaren *et al.*, 1985).

Matériels et Méthodes

Lignées et animaux: la description complète du protocole de sélection et des conditions d'élevage a déjà été donnée (Bordas *et al.*, 1992). Le critère de sélection, appelé consommation résiduelle et noté R, représente l'écart individuel de la consommation observée (O) à une valeur de cette consommation prédite à partir d'une équation de régression multiple tenant compte du poids corporel (P) et de la variation de poids (DP). Ce critère R est calculé sur une période de 28 jours de 31 à 38s. L'équation utilisée en 1994 chez les coqs est :

$$R = O - 91.0 P^{0.5} - 3.67 DP + 1907.$$

Les performances des animaux utilisés dans ce travail, données dans le tableau 1, reflètent les effets de la sélection portant sur le critère R : les valeurs de la prise alimentaire (O) diffèrent significativement entre lignées alors que le poids corporel (P) et la variation de poids (DP) sont proches entre les animaux R- et R+.

TABEAU 1: Performances moyennes des 9 coqs R- et des 10 coqs R+ retenus comme reproducteurs après la sélection sur le critère R.

caractère	lignée R-	lignée R+	valeur du t et significativité de la différence
P (g)	3 454±138	3 648±116	1,1
DP (g)	-102±24	-101±28	0,03
O (g)	2 017±133	3 798±81	11,7***
R (g)	-746±61	870±62	18,5***

*** : $P < 0,001$

Fertilité et performances à l'éclosion: cinq poules par coq ont reçu, tous les 4 j. par insémination artificielle (IA), 0.2 mL dilué au ½ dans une solution de NaCl à 7.5 g/L. Les oeufs ont été récoltés pendant 2 périodes de 3 semaines et conservés entre 12 et 14°C avant incubation. Les performances à l'éclosion de chacun des 19 coqs et chacune des femelles ont été enregistrées : les pourcentages d'oeufs clairs, de morts embryonnaires précoces (avant le 5ème jour d'incubation), de morts embryonnaires tardives (avant le 18ème jour d'incubation) et de morts en coquille (entre le 18ème jour d'incubation et l'éclosion) ont été notés.

Evaluation des éjaculats: l'étude du sperme des deux lignées a été réalisée aussitôt après la campagne de reproduction. Le volume des éjaculats a été déterminé par pesée et la concentration en spermatozoïdes a été estimée, sur 8 prélèvements effectués sur 4 semaines, par mesure de la densité optique à 535 nm sur une dilution de l'échantillon.

Motilité massale: elle a été étudiée sur 7 prélèvements, le sperme étant dilué au ½ dans du BPSE (Sexton, 1977). La notation a été réalisée d'après la méthode de Petitjean (1978) sur une échelle variant de 0 à 6.

Etude morphologique des spermatozoïdes: la coloration des spermatozoïdes a été réalisée à 4°C avec du sperme dilué au ½ en BPSE. Quarante mL de sperme dilué ont été ajoutés à 150 mL de la solution de coloration (éosine 16 g/L, nicrosine 60 g/L en BPSE). Après 2 min de coloration, 2 frottis ont été réalisés pour chacun des échantillons. Les spermatozoïdes morts, vivants et anormaux ont été observés et comptés sur un total de 300 spermatozoïdes par échantillon et ce sur 4 prélèvements par coq.

Aspects qualitatifs du plasma séminal: le plasma séminal a été préparé selon la méthode décrite par Blesbois et Hermier (1990). Les analyses ont été réalisées, pour chaque coq, sur le mélange du plasma séminal obtenu lors de 4 prélèvements. La mesure du pH a été réalisée puis les dosages de l'acide urique et des protéines ont été réalisés à l'aide de kits (Boehringer Mannheim).

Analyse du contenu mitochondrial et de l'activité mitochondriale des spermatozoïdes: cette analyse par cytométrie en flux (CMF) a été réalisée sur les spermes de 8 coqs R- et de 9 coqs R+ dilués au ½ en BPSE. Le marquage à la NAO (5×10^{-7} M) a été effectué sur 2×10^7 spermatozoïdes pendant 15 min à température ambiante (TA). Pour le marquage à la Rh123 (10^{-6} M), 2×10^6 spermatozoïdes ont été incubés pendant 30 min à TA puis marqués, 2 min avant l'analyse par CMF, à l'iodure de propidium (IP) à 50 mg/mL de façon à distinguer les spermatozoïdes morts (colorés par l'IP et présentant une fluorescence rouge) des spermatozoïdes vivants. La fluorescence verte émise après coloration à la NAO ou à la Rh123 a été recueillie à 530±30 nm alors que la fluorescence rouge émise par l'IP a été analysée à des longueurs d'ondes supérieures à 600 nm.

Analyse statistique: dans tous les cas, les variables relatives aux proportions ont été transformées avant analyse par la fonction racine carrée de l'arc sinus. Cependant, les valeurs moyennes des moindres carrés des données non transformées sont fournies pour une interprétation plus aisée. Pour les critères de fertilité et d'éclosion, les résultats issus des deux lots d'éclosion ont été sommés pour chaque accouplement et les ratios correspondants ont été calculés pour chaque couple mâle-femelle. Toutes les variables ont été analysées par analyse de variance selon le modèle: $Y_{ijk} = m + l_i + s_{ij} + e_{ijk}$, où Y_{ijk} est l'observation de la kème poule inséminée par le jème coq de la ième lignée, m est

la moyenne générale, l_i est l'effet fixe de la ième lignée, s_{ij} est l'effet aléatoire du jème coq de la ième lignée et e_{ijk} est un résidu gaussien $N(0, s^2_e)$. Comme la qualité et le contenu du sperme ont été analysés de façon répétée pour le même coq pendant 4 semaines, une analyse de variance a été menée sur l'ensemble des variables correspondantes selon le modèle: $Y_{ijk} = m + l_i + s_{ij} + d_k + (ld)_{ik} + e_{ijk}$, où Y_{ijk} est l'observation au kème jour du jème coq de la ième lignée, m est la moyenne générale, l_i est l'effet fixe de la ième lignée, s_{ij} est l'effet aléatoire du jème coq de la ième lignée, d_k est l'effet fixe du kème jour, $(ld)_{ik}$ est l'interaction entre les effets de la ième lignée et du kème jour et e_{ijk} est un résidu gaussien $N(0, s^2_e)$. Pour toutes les variables, mesurées ou calculées une seule fois pour chacun des coqs, les deux lignées ont été comparées en utilisant le test de Student.

Résultats

Fertilité et performances à l'éclosion: les différences entre les deux lignées (Tableau 2) sont très significatives ($P < 0,001$) pour le taux d'oeufs éclos/oeufs incubés et pour le taux d'oeufs clairs/oeufs incubés. De même, la mortalité embryonnaire précoce est plus élevée ($P < 0,001$) dans la lignée R+ que dans la lignées R-. Cependant, la mortalité embryonnaire tardive et la mort en coquille ne diffèrent pas entre les deux lignées. Une faible différence ($P < 0,05$) est observée entre les deux lignées pour le rapport oeufs éclos/oeufs fécondés.

TABEAU 2: Moyennes des moindres carrés et coefficients de variation (CV) des performances à l'éclosion chez les lignées R- et R+.

taux	moyenne des moindres carrés ¹		valeur de F et significativité de l'effet ²		CV ¹
	R-	R+	lignée	coq / lignée	%
Ec/Inc	0,55	0,35	13,8***	1,3	37
Cl/Inc	0,06	0,30	21,8***	2,8**	58
Ec/Fec	0,58	0,48	4,9*	0,8	39
MEP	0,09	0,21	43,3***	0,4	61
MET	0,09	0,09	0,2	1,2	86
MC	0,22	0,18	1,0	1,2	47

¹: variables non transformées

²: variables transformées par la fonction racine carrée de l'arc sinus

* : $P < 0,05$

** : $P < 0,01$

***: $P < 0,001$

Ec/Inc: Eclos/incubés

Cl/Inc: Clairs/incubés

Ec/Fec: Eclos/fécondés

MEP: Morts embryonnaires précoces/oeufs fécondés

MET: Morts embryonnaires tardives/oeufs fécondés

MC: Morts en coquille/oeufs fécondés

Evaluation des éjaculats: le volume de l'éjaculat ne diffère pas entre les deux lignées. (Tableau 3) mais la concentration en spermatozoïdes est plus élevée chez les coqs R- ; De ce fait, le nombre de spermatozoïdes par éjaculat est deux fois moins élevé chez les coqs R+ par rapport aux coqs R-. Ces différences entre lignées sont très significatives ($P < 0,001$). La motilité massale est plus élevée ($P < 0,001$) chez les animaux R- et le taux de spermatozoïdes morts est environ deux fois plus élevé ($P < 0,05$) dans la lignée R+. Aucune différence significative n'a été observée entre lignée pour les autres caractères étudiés.

TABEAU 3: moyennes des moindres carrés et coefficient de variation (CV) des variables de composition du sperme et des caractères des spermatozoïdes

Caractère	moyenne des moindres carrés ¹		valeur de F et significativité de l'effet ²				CV ¹
	R-	R+	lignée	coq/lignée	jour	lignée x jour	%
Volume (ml)	435	444	0,05	7,7***	8,6***	1,4	20
Concentr. (spz/mL)	$2,98 \times 10^9$	$1,54 \times 10^9$	24,5***	2,6**	1,7	0,7	35
Nombre spz	$1,33 \times 10^9$	$0,70 \times 10^9$	18,5***	2,6**	2,4	2,3	38
motilité	4,4	2,3	41,2***	4,0***	2,2*	3,2**	28
% morts	3,6	6,1	7,1*	1,5	2,6	1,1	64
% anorm.	4,3	5,2	0,6	5,3***	1,7	2,0	44
% vivants	92	89	3,8	3,7***	2,9*	0,2	4

¹: variables non transformées

²: variables transformées par la fonction racine carrée de l'arc sinus (les variables relatives aux proportions)

* : $P < 0,05$

** : $P < 0,01$

***: $P < 0,001$

Le facteur jour a un effet important sur le volume de l'éjaculat ($P < 0,001$) mais peu ou pas d'effet sur les autres mesures. La motilité est le seul caractère à être significativement affecté par les effets majeurs du modèle. Ce caractère présente également une interaction significative entre lignée et jour.

Aspects qualitatifs du plasma séminal: aucune différence n'a été observée entre les deux lignées en ce qui concerne le pH du plasma séminal et ses concentrations en acide urique et protéines.

Analyse du contenu mitochondrial et de l'activité mitochondriale des spermatozoïdes: une différence significative ($P < 0,01$) entre les deux lignées est observée pour la fluorescence verte émise après coloration des spermatozoïdes à la NAO : cette fluorescence est plus importante chez les spermatozoïdes des coqs R- ($76,54 \pm 3,46$ pour les coqs R- et $63,95 \pm 2,64$ pour les coqs R+). De même, la fluorescence verte émise après coloration des spermatozoïdes à la Rh123 présente une différence significative ($P < 0,01$) entre les deux lignées : $133,33 \pm 2,33$ pour les R- et $110,60 \pm 6,34$ pour les R+. Cependant, le rapport de fluorescence Rh123/NAO est similaire dans les deux lignées (1,74 et 1,73).

Discussion

Les différences entre lignées concernant le taux d'éclosion et le pourcentage d'oeufs clairs tendent à incriminer un événement proche de la fécondation.

Nous n'avons noté aucune différence entre lignées pour ce qui concerne les caractères biochimiques du plasma séminal testés mais une différence entre lignées a été observée pour le nombre moyen de spermatozoïdes par éjaculat qui est, chez les animaux R+, presque deux fois inférieur à celui des coqs R-. Ainsi, chacune des femelles R- reçoit environ 266 millions de spermatozoïdes lors d'une IA alors que la poule R+ n'en reçoit que 141 millions. Cependant, ce chiffre est encore situé dans un ordre de valeur conduisant à une IA efficace (Brillard et de Reviers, 1989). Cette différence ne devrait donc pas expliquer la différence de performance à la reproduction observée entre les deux lignées.

Chez les coqs R+, la motilité massale est plus faible et les taux de spermatozoïdes morts et anormaux sont plus élevés. Ces caractères sont certainement impliqués dans la baisse de fertilité observée comme le montrent les corrélations trouvées entre le taux de spermatozoïdes anormaux et le rapport oeufs clairs/oeufs incubés ($+0,45$, $P < 0,01$) et entre le taux de spermatozoïdes anormaux et le rapport oeufs éclos/oeufs incubés ($-0,51$, $P < 0,05$).

Enfin, l'analyse par cytométrie en flux montre que l'incorporation des deux marqueurs fluorescents est plus faible chez les animaux R+ alors que l'activité mitochondriale rapportée à la masse du chondriome (rapport Rh123/NAO) est la même d'une lignée à l'autre. Ces résultats montrent que la différence porte en fait sur la masse mitochondriale qui est 17% plus faible chez les spermatozoïdes des coqs R+.

Ainsi, la sélection pourrait avoir affecté, chez les animaux R+, une fonction cellulaire impliquant la production d'énergie qui pourrait expliquer la baisse de motilité des spermatozoïdes et les diminutions des performances de reproduction dans cette lignée.

Remerciements

Les auteurs remercient sincèrement Elisabeth Blesbois et Isabelle Grassot pour leur conseils et commentaires concernant ce travail et expriment leur reconnaissance à Baudoin Rivet pour sa contribution technique. Ce travail a été financé par l'A.I.P. "Variabilité génétique de la viabilité embryonnaire chez les animaux domestiques". Institut National de la Recherche Agronomique.

Références

- Auger J., Ronot X. and Dadoune J.P., 1989. J. Androl. 10 (6). 439-448.
- Blesbois E. and Hermier D. 1990. J. Reprod. Fert. 90, 473-482.
- Bordas A. et M^orat P. 1984. Br. Poult. Sci. 22. 25-33.
- Bordas A., Tixier-Boichard M. and M^orat P. 1992. Br. Poult. Sci. 33. 741-754.
- Bordas A. et M^orat P. 1993. Genet. Sel. Evol. 25. 397-402.
- Brillard J.P. et de Reviers M., 1989. Prod. Anim. 2. 197-203.
- Darzynkiewicz Z., Traganos F., Staiano-Coico L., Kapuscinski J. and Melamed M.R. 1981. Cancer Res. 42, 799-806.
- Folger T., Bertheussen K., Lindal S., Torbergson T. and T^oian P. 1993. Human Reproduction 8 (11). 1863-1868.
- Maftah A., Petit J.M., Ratinaud M.H. and Julien R. 1989. Biochem. Biophys. Res. Commun 164, 185-190.
- Nadakavukaren K. K., Nadakavukaren J.J. and Chen L.B. 1985. Cancer Res. 45, 6093-6099.
- Petit J. M., Maftah A., Ratinaud M.H. and Julien R. 1992. Eur. J. Biochem. 209, 267-273.
- Petit J.M., Ratinaud M.H., Cordelli E., Span^o M. and Julien R. 1995. Cytometry 19, 304-312.
- Sexton T.J. 1977. Poult. Sci. 56, 1443-1446.