

Evaluation de la concentration de semence de lapins selon 2 méthodes : Hématimètre et NucleoCounter SP100

M. THEAU-CLEMENT, J. FALIERES

INRA. Station d'Amélioration Génétique des Animaux BP 52627 - 31326 Castanet Tolosan Cedex, France

Résumé. L'objectif de cette étude est de comparer et de tester la répétabilité et la justesse des mesures de concentration de la semence de lapins selon deux méthodes : l'hématimètre (méthode de référence) et le NucleoCounter® (méthode testée). La concentration a été évaluée sur 106 éjaculats par les deux systèmes. Le pourcentage d'échantillons dont la différence relative entre deux mesures successives d'un même échantillon est supérieure à 10 % varie de 19,8 % (NucleoCounter) à 21,6 % (hématimètre). Au NucleoCounter, la corrélation entre la mesure de concentration de deux gouttes différentes prélevées dans un même tube de semence diluée est de + 0,97 ($P < 0,0001$). A l'hématimètre, la corrélation est de + 0,99 ($P < 0,0001$). Par ailleurs, la corrélation entre les mesures effectuées par les deux systèmes est de + 0,96 ($P < 0,0001$), quelle que soit la goutte. Ces résultats mettent donc en évidence une liaison positive et linéaire entre deux mesures successives d'un même échantillon ainsi qu'entre les deux systèmes. Par rapport à la méthode de référence, il est donc démontré que le NucleoCounter est un outil d'évaluation de la concentration de semence de lapins aussi répétable et juste que la méthode de référence, quelle que soit la concentration de la semence. De plus, simple et rapide, cette méthode devrait permettre, par une généralisation de l'évaluation de la concentration dans les centres d'IA, une meilleure maîtrise quantitative de la dose d'insémination.

Abstract - Evaluation of the rabbit semen concentration according to two methods: haemocytometer and NucleoCounter SP 100. The aim of that study was to compare and to test the repeatability and the accuracy of concentration measurements of rabbit semen using two methods: haemocytometer (standard method) and the NucleoCounter® (tested method). The concentration was evaluated from 106 ejaculates by both of the methods. At the NucleoCounter, the correlation between the concentration of two different drops coming from a same sample is + 0,97 ($P < 0,0001$). At the haemocytometer, the correlation is + 0,99 ($P < 0,0001$). Moreover, whatever the drop, the correlation between the measurements done by the two systems is + 0,96 ($P < 0,0001$). These results evidenced a positive and linear relation between two successive measurements of a same sample as well as between the two methods. It is demonstrated, whatever the concentration, that the NucleoCounter is an as repeatable and accurate tool for rabbit semen evaluation as the standard method. Moreover, simple and rapid, that method could allow, by a generalisation of concentration evaluation in AI Centers, a better control of quantitative aspects of the rabbit insemination dose.

Introduction

Ces dernières années, des travaux ont été conduits pour définir le nombre de spermatozoïdes minimum que doit contenir une dose pour assurer chez la lapine, une fertilité optimale (Castellini et Lattaioli, 1999 ; Theau-Clément *et al.*, 2003). Alors que l'analyse d'images assistée par ordinateur est un bon outil d'analyse de la motilité de la semence de lapins (Theau-Clément *et al.*, 1996a, Lattaioli et Castellini, 1998), son intérêt pour évaluer la concentration de la semence démontré par Farrel *et al.* (1992) et De Yi Liu *et al.* (1991) n'a pas été confirmé par Pizzi *et al.* (1993) et Theau-Clément *et al.* (1996b). Par ailleurs, la semence de lapins contenant en quantité variable, des granules d'origine prostatique très réfringents, la mesure de la densité optique ne permet pas de dénombrer de manière spécifique et précise les spermatozoïdes (Theau-Clément *et al.*, 1996b). En conséquence, la technique longtemps utilisée en laboratoire médical pour la numération sanguine (comptages sur hématimètre) est la technique de référence, elle prend cependant beaucoup de temps (environ 15 minutes par échantillon). La numération par le système Nucleocounter SP-100® étant très

rapide (35 secondes), l'objectif de ce travail est de tester et de comparer la répétabilité et la justesse des mesures effectuées selon ces deux méthodes.

1. Matériel et méthodes

1.1. Principe de l'appareil.

Le NucleoCounter SP-100 est basé sur la fluorescence de l'iodure de propidium fixé sur l'ADN des noyaux des spermatozoïdes de mammifères. Une première étape consiste à lyser les spermatozoïdes en suspension dans la semence, pour libérer les noyaux. Puis l'iodure de propidium est ajouté à la semence lysée, la lumière verte émise par une diode LED se transforme alors en lumière fluorescente rouge quand l'iodure de propidium se fixe spécifiquement sur les noyaux. Une caméra CCD détecte les signaux excités des noyaux. L'appareil étant équipé d'un système d'analyse d'images, les signaux détectés sont analysés. Par ailleurs, un logiciel permet de visualiser sur l'écran d'un ordinateur, les noyaux fluorescents sur fond noir. Le volume d'analyse étant connu ainsi que le facteur de dilution, la concentration s'affiche directement sur l'écran du NucleoCounter SP-100 (millions de spermatozoïdes/ml).

Photo 1. La semence est diluée avec un réactif permettant la lyse des cellules.



Photo 2. La semence est aspirée dans la cassette SP1.



Le système NucleoCounter SP-100 comprend outre l'instrument de mesure, le réactif S100 (distribués par ChemoMetec Gydevang 43, 3450 Allerød, Danemark) permettant de lyser les cellules (photo 1) et des cassettes SP1 (photo 2).

1.2. Dispositif expérimental.

Cent six éjaculats provenant de 20 mâles de génotype 1001 ont été analysés selon les 2 méthodes dans les heures suivant la collecte. Pour chacun d'eux, deux tubes de semence diluée sont préparés. Pour chaque système, 2 gouttes d'un même échantillon ont été prélevées et analysées successivement.

Pour l'évaluation de la concentration au NucleoCounter, la semence est diluée dans un premier tube avec un réactif permettant la lyse des cellules (photo 1). Ainsi, 50 μ l de semence sont dilués dans 10 ml de réactif S100. En effet, la Société ChemoMetec indique que pour une semence contenant de 250 à 1000 10^6 spermatozoïdes/ml, la précision est optimale pour une dilution de 1/200. La semence de lapins contenant généralement moins de 1000 10^6 spermatozoïdes/ml, cette dilution a été systématiquement appliquée. Dans un deuxième temps, la semence est aspirée dans la cassette SP1 (photo 2) en appuyant doucement sur le piston, ainsi

Photo 3. La cassette est introduite dans le NucleoCounter, l'analyse est lancée.

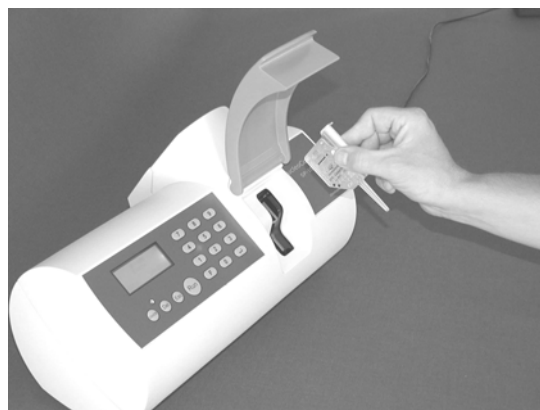
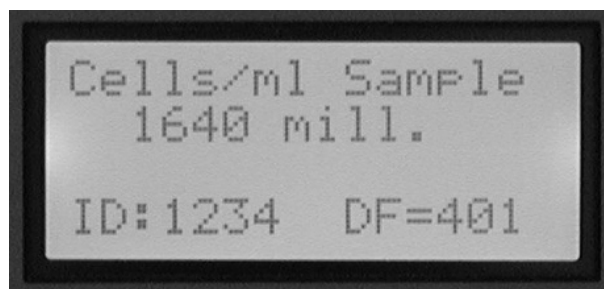


Photo 4. La concentration s'affiche sur l'écran 35 secondes après. ID= identification, DF= facteur de dilution.



60 μ l de semence diluée et lysée est introduite dans la cassette. L'iodure de propidium stocké dans les trois premières pistes de la cassette est mélangé à la semence, il se fixe alors à l'ADN et colore le noyau des cellules. La cassette est introduite dans le Nucleocounter (photo 3), l'analyse est alors lancée. Un microlitre de semence diluée dans du réactif S100 est analysée dans la chambre de la cassette. De 30 à 35 secondes après, la concentration de l'éjaculat s'affiche sur l'écran. (photo 4).

Dans un deuxième tube, la semence est diluée dans les mêmes proportions en remplaçant le réactif S100 par le citrate à 3,6g/l. La numération sur hématimètre (cellule de Thoma) est réalisée selon la méthode décrite par Boussit (1989). Avant la dilution et chaque évaluation de la concentration, les tubes sont homogénéisés énergiquement.

1.3. Analyses statistiques.

La corrélation entre deux mesures successives d'un même échantillon intra-système et la corrélation entre les mesures faites entre les deux systèmes sont analysés en utilisant la procédure Proc Corr de SAS (coefficient de Pearson). De plus, un ajustement par régression linéaire a été réalisé.

2. Résultats et discussion

Sur la première goutte, la concentration mesurée au NucléoCounter est de $636 \pm 429 \cdot 10^6$ spermatozoïdes/ml, elle a varié de 37 à $1887 \cdot 10^6$ spermatozoïdes/ml. Sur la deuxième goutte, la concentration est en moyenne de $629 \pm 418 \cdot 10^6$ spermatozoïdes/ml, elle a varié de 36 à $1948 \cdot 10^6$ spermatozoïdes/ml. A l'hématimètre, sur la première goutte, la concentration est en moyenne de $652 \pm 420 \cdot 10^6$ spermatozoïdes/ml, elle a varié de 25 à $2006 \cdot 10^6$ spermatozoïdes/ml. Sur la deuxième goutte, la concentration est en moyenne de $659 \pm 436 \cdot 10^6$ spermatozoïdes/ml, elle a varié de 28 à $2265 \cdot 10^6$ spermatozoïdes/ml.

La proportion d'échantillons pour lesquels la différence relative entre les 2 mesures est supérieure à 10 % ne varie pas entre les 2 systèmes (NucleoCounter : 19,8 %, hématimètre : 21,6 %). Cependant la proportion d'échantillons pour lesquels la différence relative entre deux mesures est supérieure à 25 % est plus faible pour l'hématimètre (respectivement : 2,8 vs 4,7 %). En fait, l'écart entre les deux systèmes n'est dû qu'à deux échantillons pour lesquels la concentration étant supérieure à $1000 \cdot 10^6$ spermatozoïdes/ml, une dilution au 1/400 aurait dû être appliquée.

Répétabilité. Au NucleoCounter, la corrélation entre la mesure de concentration de deux gouttes différentes prélevées dans un même tube de semence diluée est de + 0,97 ($P < 0,0001$, figure 1). A l'hématimètre, la corrélation est de + 0,99 ($P < 0,0001$, figure 2). Cependant, 24 % des échantillons avaient une concentration supérieure à $1000 \cdot 10^6$ spermatozoïdes/ml pour lesquels une dilution au 1/400 aurait dû être appliquée. Sur les échantillons contenant strictement moins de $1000 \cdot 10^6$ spermatozoïdes/ml, les corrélations entre les mesures faites au NucleoCounter et à l'hématimètre restent stables (respectivement : $r = + 0,98$, goutte 2 : $r = + 0,99$). Ces résultats mettent donc en évidence intra-système et quel que soit le système, une liaison positive et linéaire entre deux mesures successives d'un même échantillon, quelle que soit la concentration des échantillons.

Justesse. Elle peut être appréciée par l'étude des relations entre les valeurs obtenues par la méthode de référence (hématimètre) et le NucléoCounter. Ainsi, quelle que soit la goutte, la corrélation entre les mesures effectuées par les 2 systèmes est de + 0,96 ($P > 0,0001$, figures 3 et 4). Sur les échantillons de concentration inférieure à $1000 \cdot 10^6$ spermatozoïdes/ml, les corrélations sont similaires (goutte 1 : $r = + 0,97$, goutte 2 : $r = + 0,96$). La corrélation des mesures entre deux systèmes est très supérieure à celles obtenues jusqu'ici. En effet, Pizzi *et al.* (1993) ont obtenu une corrélation de + 0,57 quand la concentration est mesurée sur hématimètre et par analyse d'images assistée par ordinateur (système Cellsoft). De même Theau-Clément *et al.* (1996a) ont

Figure 1. Corrélation entre 2 mesures successives d'un même échantillon (2 gouttes) au Nucléocounter SP 100.

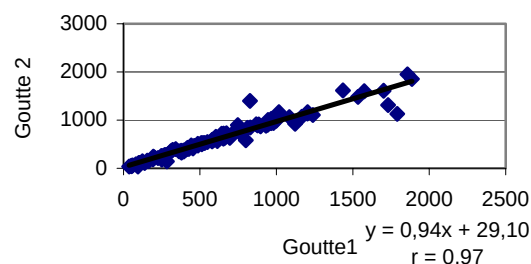


Figure 2. Corrélation entre 2 mesures successives d'un même échantillon (2 gouttes) à l'hématimètre.

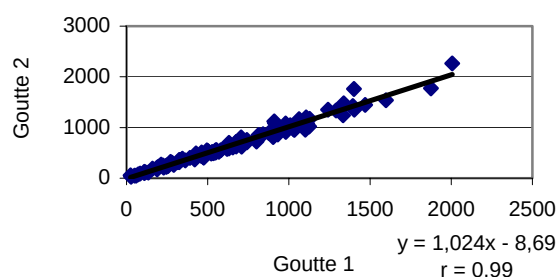


Figure 3. Corrélation entre les mesures faites au NucléoCounter SP100 et à l'hématimètre (goutte1).

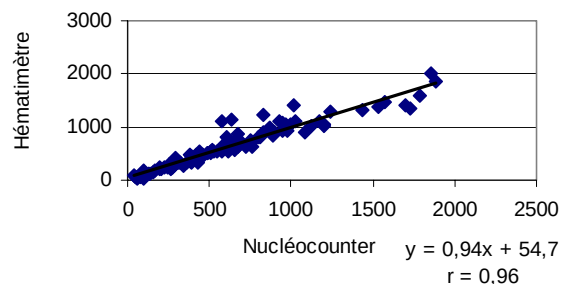
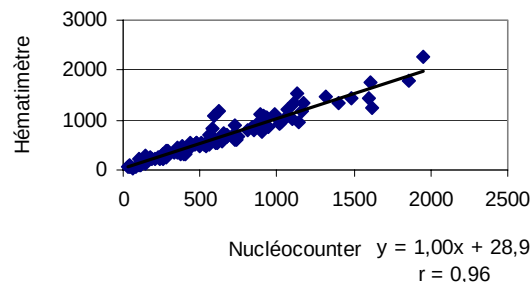


Figure 4. Corrélation entre les mesures faites au NucléoCounter SP100 et à l'hématimètre (goutte2).



obtenu des corrélations plus faibles quand ils ont comparé la concentration mesurée sur hématimère avec celle obtenue par photométrie ($r=+ 0,66$) ou par analyse d'images assistée par ordinateur (système HTMA-Ivos, $r=+ 0,68$).

Conclusion

La corrélation élevée entre deux mesures de concentration intra-système et entre systèmes démontre que le NucleoCounter est un outil d'évaluation de la concentration de semence de lapins aussi répétable et juste que la méthode de référence, quelle que soit la concentration des échantillons. De plus, simple et rapide, cette méthode devrait permettre une meilleure maîtrise quantitative de la dose d'insémination.

Remerciements

Les auteurs remercient la Société ChemoMetec et P. Sigsgaard pour le prêt de l'instrument, la fourniture des accessoires et réactifs nécessaires à cette étude, ainsi que l'ensemble des techniciens de l'élevage lapins de la Station d'Amélioration Génétique des Animaux pour leur collaboration efficace.

Références

BOUSSIT, D. 1989. Reproduction et insémination artificielle en cuniculture. *Association Française de Cuniculture*, Lempdes, Paris. pp. 234.

CASTELLINI, C. ET LATTAIOLI, P. 1999. Effect of number of

motile sperms inseminated on reproductive performance of rabbit does. *Anim. Reprod. Sci.* 57: 111-120.

- DE YI LIU., CLARKE, G.N., GORDON BAKER, H.W. 1991. Relationship between Sperm motility assessed with the Hamilton-Thorn Motility Analyser and Fertilization Rates In Vitro. *J. Andrology*, 12 (4): 231-239.
- FARRELL, P.B., FOOTE, R.H., LOOMIS, P.R. 1992. Elimination of granule interference facilitating accurate casa analysis of rabbit sperm. *J. Andrology*, abstract 108.
- LATTAIOLI, P., ET CASTELLINI, C. 1998. Efficacité d'un système d'analyse d'images pour évaluer la semence de lapin : précision et répétabilité. *7èmes Journées de la Recherche Cunicole*; Lyon, 13-14 mai : 233-236.
- PIZZI, F., LUZI, F., CATANZARITI, G., CRIMELLA, C. 1993. Confronto tra un sistema computerizzato di analisi e metodiche classiche per la valutazione del materiale seminale di coniglio. *Atti 10° Congresso Nazionale ASPA*: 715-720.
- THEAU-CLEMENT M., LATTAIOLI P., ROUSTAN A., CASTELLINI C. 1996a. A comparison between computerised semen image analyses and visual methods to evaluate various biological parameters in rabbit semen. *6th World Rabbit Congress*, Toulouse 1996, Vol 2, 133-137.
- THEAU-CLEMENT, M., LATTAIOLI, P., ROUSTAN, A., CASTELLINI, C. 1996b. Reliability and accuracy of a computerised semen image analyses to evaluate various biological parameters in rabbit semen. *6th World Rabbit Congress*, Toulouse 1996, Vol 2, 139-143.
- THEAU-CLEMENT M., DELHOMME, G., VALTEAU, C. RIDEAUD, P., FALIERES, J., MERCIER, P. 2003. Influence du nombre de spermatozoïdes inséminés sur les performances de reproduction des lapines en fonction de leur état physiologique. *10èmes Journées de la Recherche Cunicole*, 19-20 nov.. 2003, Paris: 73-76.