

Variabilité et relations phénotypiques de plusieurs caractéristiques de production et de qualité du sperme chez le lapin

M. GARCÍA-TOMÁS^{1,2}, J. SÁNCHEZ², O. RAFEL¹, J. RAMON¹, M. PILES¹

¹IRTA – Unitat de Cunicultura, Torre Marimón s/n., 08140 Caldes de Montbui, Barcelone, Espagne.

²Departament de Fisiologia. Facultat de Biologia. Universitat de Barcelona, Av. Diagonal, 645 3^a planta 08028 Barcelone, Espagne.

Résumé. Un total de 2140 éjaculats de 156 mâles adultes appartenant à 4 groupes de mâles a été étudié. L'analyse en composantes principales et l'estimation des corrélations phénotypiques ont été réalisées afin d'examiner les relations existant entre les caractéristiques qualitatives et quantitatives du sperme du lapin. Les quatre premières composantes principales (CP) représentent 62 % de la variation totale. Le pourcentage de spermatozoïdes vivants (Vi), de spermatozoïdes ayant une intégrité acrosomique (NAR), de spermatozoïdes normaux (Nr), et d'anomalies morphologiques du col/pièce intermédiaire (Nm) et du flagelle (T) du sperme sont les variables prédominantes dans la première CP. La motilité d'ensemble et individuelle (Mm, Mi), le pH, la concentration (Cn) et nombre total de spermatozoïdes par éjaculat (TSE) sont localisés dans la seconde. Le pourcentage de spermatozoïdes avec une gouttelette cytoplasmique proximale et distale (Dp, Dd), Vi, NAR et Nr sont les caractéristiques prédominantes dans la troisième et le volume (V) définit la quatrième.

Abstract. Variability and phenotypic correlations of some production and quality traits of rabbit semen. A total of 2140 ejaculates from 156 adult males pertaining to 4 groups of bucks were analysed. Principal component analysis and phenotypic correlations were performed in order to examine the relationships between qualitative and quantitative traits of rabbit semen. The first four principal components (PC) explained 62 % of total variation. Percentage of sperm viability (Vi), percentage of sperm with acrosome integrity (NAR), percentage of sperm normalcy (Nr), percentage of sperm morphological abnormalities of neck-midpiece (Nm) and tail (T) were the predominant variables in the first PC. Mass and individual motility (Mm, Mi), pH, concentration (Cn) and total number of spermatozoa per ejaculate (TSE) were located in the second. Percentage of sperm with the presence of proximal and distal cytoplasmic droplet (Dp, Dd), NAR, Vi and Nr were the predominant traits in the third and volume (V) defined the fourth.

Introduction

La qualité du sperme est habituellement décrite à travers un large spectre de caractéristiques : caractéristiques qualitatives de l'éjaculat, caractéristiques reliées à la composition biochimique de l'éjaculat, caractéristiques qualitatives des spermatozoïdes ou caractéristiques de la dose d'insémination. La plupart de ces mesures sont corrélées, ce qui rend plus difficile l'analyse des données et l'interprétation des résultats dans les études sur leur relation avec la fertilité. Il est donc important d'établir si elles doivent être remplacées par un plus petit nombre des mesures sans perte importante d'information. Cela impliquerait l'obtention d'un ensemble plus petit de mesures expliquant la plupart de la variabilité observée. En considérant ce fait, l'objectif de cette recherche a été de réaliser une analyse en composantes principales de plusieurs caractéristiques de la qualité du sperme en utilisant du sperme de mâles adultes appartenant à deux souches sélectionnées et leurs croisements réciproques.

1. Matériel et Méthodes

L'essai a été réalisé dans l'élevage expérimental de l'Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (IRTA) au cours de deux périodes correspondant aux saisons chaude et froide en Espagne.

1.1. Animaux

Les données concernent 156 mâles de deux souches parentales de lapin et leurs croisements réciproques. Après le sevrage, les mâles ont été soumis à une photopériode de 16 heures de lumière/jour et à des plages de températures allant de 14 à 24,4°C. Les animaux ont été alimentés avec 180 g/jour d'un aliment commercial (16% de protéine brute, 4,3% de graisses, 17% de fibres). Ils avaient toujours de l'eau fraîche *ad libitum*.

1.2 Prélèvement du sperme

À l'âge de cinq mois, les mâles ont débuté leur entraînement au vagin artificiel. À l'âge de six mois, ils entrent en phase de production. Pendant 7 semaines, deux éjaculats par mâle et par semaine ont été prélevés, avec un intervalle de 30 minutes entre les prélèvements.

1.3 Évaluation du sperme et caractères contrôlés

Tous les éjaculats ont été stockés à 37°C dans un bain d'eau avant de les évaluer, dans les 15 minutes après leur prélèvement. Les éjaculats contenant des dépôts d'urine et de carbonate de calcium ont été écartés. Le volume (V) et le pH de l'éjaculat ont été déterminés en utilisant une éprouvette graduée et un pH-mètre 507 Crison, respectivement. Les tampons de gels, quand il y en avait, ont été retirés avant l'évaluation du volume. La motilité d'ensemble (Mm) a été

évaluée conformément à une échelle subjective de 1 à 5, en utilisant des aliquots (10µl) de sperme brut et un microscope optique (Nikon) à x10. Des aliquots (10µl) de sperme brute ont été fixées en utilisant une coloration vitale d'éosine-nigrosine (Bamba, 1988) pour permettre des mesures ultérieures des caractéristiques de la qualité du sperme en examinant 200 spermatozoïdes avec un microscope optique (Olympus CH-3) à x1000 et en calculant les rapports suivants : pourcentage de spermatozoïdes vivants (Vi), pourcentage de spermatozoïdes ayant une intégrité acrosomique (NAR), pourcentage de spermatozoïdes normaux (Nr), pourcentage d'anomalies morphologiques de la tête (H), du col/pièce intermédiaire (Nm) et du flagelle (T),

pourcentage de spermatozoïdes avec gouttelette cytoplasmique proximale et distale (Dp, Dd).

Les éjaculats ont été ensuite dilués (1:5) dans un diluent commercial pour sperme de lapin (KUBUS m.r.a S.A, Madrid, Espagne) et la motilité individuelle (Mi) a été évaluée avec un microscope à contraste de phase (Nikon) à x400 en utilisant une échelle subjective de 0 à 5 (Roca *et al.*, 2000). La concentration (Cn) a été mesurée en utilisant des spermatozoïdes fixés (2% de glutaraldéhyde) avec un hématicmètre Thoma-Zeiss (dilution finale 1:50) et un microscope optique (Olympus CH-2) à x400. La variable synthétique nombre total de spermatozoïdes par éjaculat ($TSE = V * Cn$) a également été calculée.

Figure 1. Projection des variables sur le plan défini par la première et la seconde composante principale.

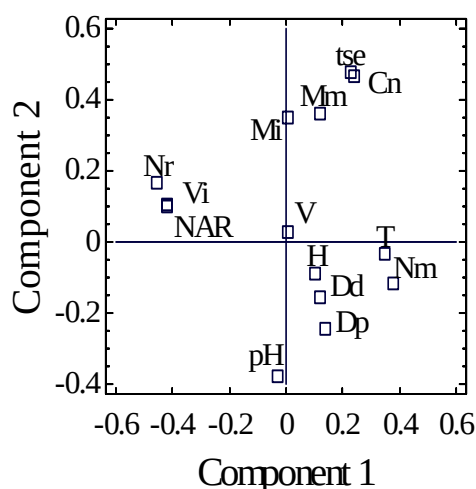


Figure 2. Projection des variables sur le plan défini par la première et la troisième composante principale.

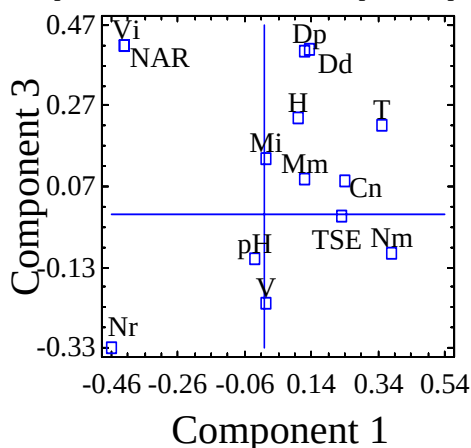


Figure 3. Projection des variables sur le plan défini par la seconde et la troisième composante principale. Abréviations : les abréviations sont les mêmes que dans la figure 1.

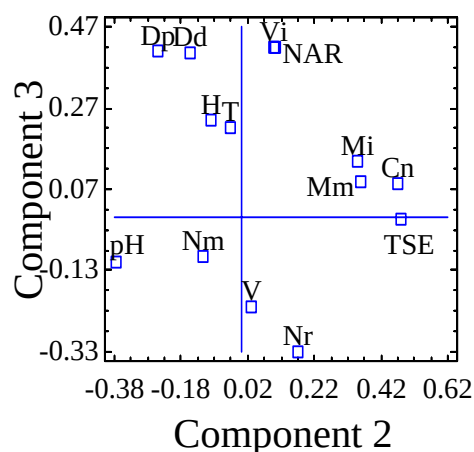


Figure 4. Projection des variables sur le plan défini par la première et la quatrième composante principale.

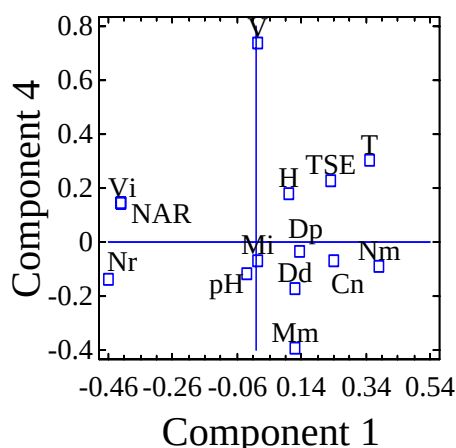


Fig. 1 à 4 :V: volume de l'éjaculat, Mm : motilité d'ensemble, Mi : motilité individuelle, Cn : concentration, TSE: nombre total de spermatozoïdes par éjaculat, Vi : pourcentage de spermatozoïdes vivants, NAR : pourcentage de sperme avec intégrité acrosomique, Nr : pourcentage de spermatozoïdes normaux, H : pourcentage d'anomalies morphologiques de la tête, Nm : pourcentage d'anomalies morphologiques du col/pièce intermédiaire, T : pourcentage d'anomalies morphologiques du flagelle, Dp : pourcentage de sperme avec gouttelette cytoplasmique proximale, Dd : pourcentage de sperme avec gouttelette cytoplasmique distale.

Tableau 1. Coefficients de corrélation entre les variables comprises dans l'analyse en composantes principales.

	PH	V ¹	Mm ¹	Mi ¹	Cn ¹	TSE ¹	Vi ¹	NAR ¹	Nr ¹	H ¹	Nm ¹	T ¹	Dp ¹	Dd ¹
PH	-													
V	-0,07*	-												
Mm	-0,41*	-0,16*	-											
Mi	-0,48*	-0,02	0,52*	-										
Cn	-0,41*	-0,1*	0,47*	0,35*	-									
TSE	-0,41*	0,19*	0,39*	0,34*	0,87*	-								
Vi	-0,24*	-0,07	0,11	0,27*	-0,01	-0,04	-							
NAR	-0,19*	-0,04	0,06*	0,21*	-0,05	-0,07*	0,98*	-						
Nr	-0,02	0,06	-0,02	0,04	-0,14*	-0,13*	0,23*	0,28*	-					
H	0,03	-0,04	0,03	0,02	-0,01	0,01	0,09	0,04	-0,17*	-				
Nm	0,02	0,05	-0,02	-0,03	0	0,02	-0,38*	-0,48*	-0,45*	0,07*	-			
T	0,01	-0,03	0,04	0,04	0,21*	0,21*	-0,15*	-0,16*	-0,72*	0,09*	0,11*	-		
Dp	0,16*	-0,04*	-0,12*	-0,17*	-0,13*	-0,14*	-0,04	-0,07	-0,38*	0,11*	0,12*	0,04	-	
Dd	-0,04	-0,09*	0	-0,02	-0,03	-0,08*	0,05	0	-0,32*	0,09*	0,09*	0,01	0,28*	-

* différence significative a P<0.05

V : volume de l'éjaculat (ml), Mm : motilité d'ensemble, Mi : motilité individuelle, Cn: concentration (x10⁶/ml), TSE : nombre total de spermatozoïdes par éjaculat (x10⁶), Vi : pourcentage de spermatozoïdes vivants, NAR : pourcentage de sperme avec intégrité acrosomique, Nr : pourcentage de spermatozoïdes normaux, H : pourcentage d'anomalies morphologiques de la tête, Nm : pourcentage d'anomalies morphologiques du col-pièce intermédiaire, T : pourcentage d'anomalies morphologiques du flagelle, Dp : pourcentage de sperme avec gouttelette cytoplasmique proximale, Dd : pourcentage de sperme avec gouttelette cytoplasmique distale.

1.4 Analyses statistiques

Les corrélations phénotypiques entre les caractéristiques du sperme ont été obtenues en utilisant Proc Corr du progiciel SAS v.8. Les corrélations phénotypiques entre les caractéristiques de la qualité du sperme ont été évaluées comme une corrélation résiduelle à partir d'une analyse de variance des caractéristiques du sperme avec les effets fixés : type génétique du mâle (quatre niveaux : C, CxR, RxR, R), ordre de l'éjaculat (premier et second), jour de prélèvement et l'effet aléatoire permanent non additif du mâle auquel correspond l'observation. Une analyse en composantes principales sur les résiduelles de l'analyse de variance a été réalisée avec la procédure Princomp du progiciel SAS v.8.

2. Résultats et discussion

Les figures 1, 2, 3 et 4 montrent les résultats de l'analyse en composantes principales (CP) et le tableau 1 donne les coefficients de corrélation entre toutes les variables étudiées. Les quatre premières CP représentent 62 % de la variation totale (23 %, 18 %, 12 % et 8 %, respectivement). Le pourcentage de spermatozoïdes vivants, NAR, Nr, Nm et T sont les variables prédominantes définissant la première CP puisque elles sont distribuées loin de l'origine. Néanmoins seules Nm et T sont proches des axes. Les pourcentages de spermatozoïdes vivants, NAR et Nr vont également contribuer à la troisième CP puisque elles sont à la même distance des plans définis par CP1 et CP2 et par CP3 et CP2. Les variables liées à la présence de gouttelette cytoplasmique, distribuées loin de l'origine et près de la troisième CP, sont les variables qui définissaient le mieux cette CP. Les variables Vi et NAR ont des positions très proches sur le plan défini par la première et la seconde CP, ce qui

reflète leur forte corrélation (0,98). Ceci indique qu'elles mesurent pratiquement le même phénomène : l'intégrité des membranes. Ces deux variables et Nr sont séparées du groupe des variables définissant les anomalies des spermatozoïdes (Nm, T, H, Dp et Dd) de 180°, ce qui indique une corrélation négative entre les deux groupes de variables. La corrélation avec Nm de Vi et de NAR est modérée et négative (-0,38 et -0,48 respectivement). Conformément à notre critère, les anomalies du col-pièce intermédiaire du spermatozoïde supposent une séparation entre la tête et le flagelle des spermatozoïdes, une rupture de la partie moyenne du flagelle et/ou une pièce intermédiaire épaissie. Les deux premières causes pourraient affecter l'intégrité de la membrane plasmique conduisant à une diminution de Vi et NAR. Comme escompté, Nr est négativement corrélée à tous les types d'anomalies morphologiques (H, Nm, T, Dp et Dd), de façon forte avec T (-0,72) et modérée avec Nm (-0,45), ces types d'anomalies étaient plus fréquents que les autres, comme cela a également été observé par Kuzminsky (1996) et Finzi *et al.* (1995)

Toutes les variables mesurant les différents types d'anomalies morphologiques montrent de faibles corrélations entre elles, ce qui suggère des causes différentes, en particulier parce que ces anomalies se produisent en des lieux différents de l'appareil génital. Par exemple, H et Nm sont créées dans la région testiculaire (Axner *et al.*, 1999 chez le chat; Perez-Sanchez *et al.*, 1997 chez le lapin; Toyama *et al.*, 1996 chez le sanglier) alors que la morphogenèse de T et la migration de la gouttelette cytoplasmique se produisent dans l'épididyme (Axner *et al.*, 1999 chez le chat; Perez-Sanchez *et al.*, 1997 chez le lapin; Holt, 1982 chez le sanglier). Cependant, cette corrélation est positive, ce qui indique que le sperme présentant

un certain degré d'anomalie morphologique tend à montrer d'autres types d'anomalies. Panidis *et al.* (1988) et Rouso *et al.* (2002) ont également observé, chez l'homme, que les spermatozoïdes ayant une tête anormale présentaient de façon significative plus d'anomalies du col, du flagelle et de la gouttelette cytoplasmique. Bonet *et al.* (2000), chez les porcs, ont rapporté que les spermatozoïdes immatures, qui habituellement présentent des gouttelettes cytoplasmiques, un plus grand développement de la protubérance apicale de l'acrosome et une plus grande flexibilité de la tête, sont souvent plus fragiles que les spermatozoïdes matures.

Les variables mesurant la motilité des spermatozoïdes, le pH, le nombre et la concentration des spermatozoïdes dans l'éjaculat sont localisées dans une seconde CP. Ceci indique une variation qui n'est pas reliée à des variables définissant des anomalies morphologiques ni à l'intégrité des membranes des spermatozoïdes, car toutes les CP révèlent des combinaisons de caractéristiques qui ne sont pas en corrélation. Ainsi, les corrélations observées entre ceux deux groupes de variables sont toujours très faibles.

La corrélation entre les deux mesures de la motilité est modérée et positive (0,52) et confirme les résultats de Bencheikh (1995). La corrélation entre TSE et Cn est élevée (0,87), les points étant presque à la même position sur le plan défini par les deux premières CP. Cette corrélation est bien plus élevée que celle entre TSE et V (0,19), ce qui indique que dans cette variable synthétique les différences sont principalement dues à des différences dans Cn. Ce résultat a également été rapporté par Brun *et al.* (2002). TSE et Cn sont aussi positivement corrélées à Mm (0,39 et 0,47) et Mi (0,34 et 0,35), comme cela a déjà été rapporté par Battaglini *et al.* (1992), Bencheikh (1995) et Brun *et al.* (2002). La corrélation entre le pH et Mm, Mi, Cn et TSE est modérée et négative (-0,41, -0,48, -0,41 et -0,41, respectivement). La relation antagoniste entre ces caractéristiques a également été rapportée par Battaglini *et al.* (1992), Bencheikh (1995) et Brun *et al.* (2002). Ceci pourrait être expliqué par l'activité métabolique des spermatozoïdes qui libèrent de l'acide lactique, un acide provoquant une diminution du pH (Brun *et al.*, 2002).

La variable V semble importante dans la définition de la 4^e CP. Cette variable n'est pas liée à la plupart des autres caractéristiques. Brun *et al.* (2002) n'ont pas trouvé de corrélations importantes entre V et toute autre caractéristique élémentaire.

Conclusion

Les quatre composantes principales (CP) représentent 62 % de la variation totale. Les caractéristiques de la qualité du sperme ont été réparties en des ensembles indépendants : variables liées à la morphologie et à l'intégrité de la membrane des spermatozoïdes ;

variables mesurant le pH, la motilité des spermatozoïdes et la concentration ; et le volume de l'éjaculat. Nos résultats dégagent trois groupes de variables avec des corrélations intragroupe de fortes à modérées, ce qui suggère qu'elles peuvent être utilisées pour mesurer le même phénomène : le pourcentage de spermatozoïdes vivants et le pourcentage de spermatozoïdes ayant une intégrité acrosomique ; la motilité d'ensemble et la motilité individuelle ; le pourcentage de spermatozoïdes normaux et le pourcentage de spermatozoïdes présentant une anomalie morphologique de l'ensemble 'col-pièce intermédiaire' et du flagelle. Ainsi, la variable importante la plus facile à obtenir pourrait être utilisée afin d'améliorer l'efficacité de l'évaluation des caractéristiques du sperme dans des laboratoires ou dans des centres d'insémination artificielle.

Références

- AXNER E, LINDE-FORSBERG C AND EINARSSON S 1999. Morphology and motility of spermatozoa from different regions the epididymal duct in the domestic cat. *Theriogenology*, ; 52(5): 767-78.
- BAMBA K. 1988. Evaluation of acrosomal integrity of boar spermatozoa by bright field microscopy using an eosin-nigrosin stain. *Theriogenology* 29:1245-1251.
- BATTAGLINI M, CASTELLINI C AND LATTAIOLI P 1992. Variability of the main characteristic of rabbit semen. *J. Applied Rabbit Res.* 15: 439-446.
- BENCHEIKH N. 1995. Effet de la fréquence de collecte de la semence sur les caractéristiques du sperme et des spermatozoïdes récoltés chez le lapin. *Ann Zootech* 44, 263-279.
- BONET S, BRIZ M, PINART E, SANCHO S, GARCIA-GIL N AND BADIA E 2000. Morfología Espermática en porcí. Ed. Intitut d'Estudis Catalans, 1e éd., Barcelone.
- BRUN JM, THEAU-CLEMENT M AND BOLET G 2002 Evidence for heterosis and maternal effects on rabbit semen characteristics. *Anim. Res.* 51:433-442.
- FINZI A, MORERA P AND KUZMINSKY G 1995. Sperm abnormalities as possible indicators of rabbit chronic heat stress. *World Rabbit Sci.* 3(4): 157-161.
- HOLT W 1982. Epididymal origin of a coiled-tail sperm defect in a boar. *J. Reprod. Fert.*; 64(2): 485-489.
- KUZMINSKY G, FAUSTO AM AND MORERA P 1996. Morphological abnormalities of rabbit spermatozoa studied by scanning electron microscope and quantified by light microscope. *Reprod. Nutr. Dev.* 36: 565-575.
- PANIDIS D, VLASSIS G, VAYIONAS M, MATALLIOTAKIS I AND KALOGEROPOULOS A 1988. Coexistence of spermatozoa morphological abnormalities in the semen of potentially fertile men. *European J. Obst. Gyn. Reprod. Biol.* 29(4):281-286.
- PEREZ-SANCHEZ F, TABLADO L AND SOLER C 1997. Sperm morphological abnormalities appearing in the male rabbit reproductive tract. *Theriogenology*; 47: 893-901.
- ROUSSO D, KOURTIS A, MAVROMATIDIS G, GKOUTZIOULIS F, MAKEDOS G AND PANIDIS D 2002. Pyriform head: a frequent but little-studied morphological abnormality of sperm. *Arch. Andrology*; 48(4): 267-272.
- ROCA J, MARTINEZ S, VAZQUEZ JM, LUCAS X, PARRILLA I AND MARTINEZ EA 2000. Viability and fertility of rabbit spermatozoa diluted in Tris-buffer extenders and stored at 15°C. *Anim. Reprod. Sci.* 64 (2000) 103-112.
- TOYAMA Y AND ITOH Y 1996. Ultrastructural features and pathogenesis of decapitated spermatozoa in boar. *Andrologia*; 28 (2): 109-115.