

POSSIBILITÉ D'APPLICATION DE LA TECHNIQUE DE DIFFUSION INÉLASTIQUE DE LA LUMIÈRE A L'ÉTUDE DE LA VITALITÉ DES SPERMATOZOÏDES DE TAUREAUX

Mireille ADAM, Anne HAMELIN, P. BERGÉ et M. GOFFAUX (1)

*Service de Physique du Solide et de Résonance magnétique,
Centre d'Études nucléaires de Saclay, BP n° 2, 91 - Gif-sur-Yvette*

SOMMAIRE

La lumière diffusée par des spermatozoïdes est analysée spectrographiquement par la technique des battements de photons. Cette méthode physique permet de comparer la vitalité de différents échantillons : elle est objective, fidèle, sensible et rapide. En outre, le mouvement des spermatozoïdes n'est pas gêné par les conditions expérimentales.

I. — PRINCIPE DE LA MÉTHODE

La méthode de spectroscopie par battements de photons nous permet de déterminer le spectre de la lumière diffusée par une population de spermatozoïdes de taureaux en solution dans un dilueur classique. Le faisceau incident est parfaitement monochromatique, sa fréquence ν_0 étant de $5 \cdot 10^{14}$ Hz (la source lumineuse est un laser à gaz hélium-néon).

Le faisceau diffusé est composé d'un ensemble d'ondes de fréquences ν_i différentes ou égales à ν_0 . Chacune des variations de fréquence correspondante $\Delta\nu_i = \nu_i - \nu_0$ est due à l'effet Doppler subi par la lumière incidente diffusée par un spermatozoïde en mouvement.

Si la direction de la lumière diffusée recueillie fait un angle θ avec la direction de la lumière incidente et que l'on considère un spermatozoïde animé d'une vitesse de translation V on aura :

$$\Delta \nu_i = \frac{2V}{C} \nu_0 \cos \alpha_i \frac{\sin \theta}{2}$$

(1) U.N.C.E.I.A. Laboratoire de Contrôle des Géniteurs 13, rue Jouet, 94 - Maisons-Alfort.

où C représente la vitesse de la lumière et α_i l'angle entre la direction de translation du spermatozoïde i et la bissectrice OK de l'angle obtus formé par les faisceaux incidents et diffusés (fig. 1).

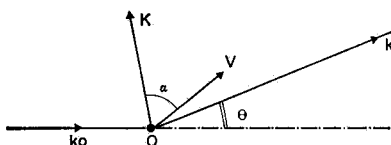


FIG. 1. — Schéma descriptif de la diffusion Rayleigh
Diffusion Rayleigh par une particule animée d'une vitesse \vec{V}

Les spermatozoïdes se déplaçant tous à la vitesse V , mais dans toutes les directions, α_i prendra toutes les valeurs comprises entre 0 et 2π . Les écarts de fréquences $\Delta\nu_i$ vont varier entre $\Delta\nu = 0$ (pour $\alpha = \frac{\pi}{2}$ ou $\frac{3\pi}{2}$) et $\Delta\nu_{\max} = \pm \frac{2V}{C} \nu_0 \sin \frac{\theta}{2}$ (pour $\alpha_i = 0$ ou π).

Ce schéma, qui justifie bien un élargissement du spectre de la lumière diffusée, est très simplifié car il ne tient compte ni de la dispersion de la vitesse des spermatozoïdes, ni du fait qu'au mouvement de translation viennent s'ajouter des mouvements de rotation et de vibration.

Ces deux faits provoquent un élargissement supplémentaire du spectre de la lumière diffusée qui n'a pas une forme analytique simple.

Le calcul théorique permettant de déduire, à partir des spectres expérimentaux, la répartition des vitesses et le nombre des spermatozoïdes vivants, n'a pas encore été effectué. Cependant, nous avons pu vérifier que la largeur à mi-hauteur Γ des spectres de la lumière diffusée $I = f(\nu)$ est une fonction croissante de la « vitalité » de l'ensemble des spermatozoïdes. Nous définissons la « vitalité » comme la somme des produits $n_i V_i$ où n_i est le nombre de spermatozoïdes animés de la vitesse V_i . Cette dépendance de Γ en fonction de la vitalité nous permet de faire une étude comparative des différents échantillons.

II. — INTÉRÊT DE LA MÉTHODE

Quelques mesures préliminaires nous ont permis de déterminer les caractéristiques de cet appareillage déjà décrit par ailleurs. (BERGÉ et VOLOCHINE, 1967 ; ADAM, HAMELIN et BERGÉ, 1969).

Le tableau 1 montre que les mesures sont reproductibles à 5 p. 100 près. Ces 5 p. 100 sont dus essentiellement aux erreurs effectuées lors des préparations des échantillons de concentration $80\text{-}10^6$ sperm/ml et lors de la détermination de la largeur à mi-hauteur des spectres dont la moyenne statistique est 166 Hz.

Le pouvoir de résolution de notre appareillage est de 3 hertz. Mais tant que nous n'aurons pas la relation théorique entre le spectre expérimental de la lumière diffusée et la vitalité de l'échantillon, nous ne pourrons pas relier le pouvoir de résolution instrumental à une sensibilité sur la vitalité.

L'intérêt de cette méthode est sa rapidité (durée de la mesure : 30 secondes), son objectivité et la possibilité qu'elle donne d'étudier des spermatozoïdes dans une cellule suffisamment grande pour que leurs mouvements ne soient pas entravés.

TABLEAU I

Répétabilité des mesures

Numéro de l'expérience	1	2	3	4	5	6	7	8
Largeur à mi-hauteur valeur expérimentale (Hz)	175	169	161	172	161	177	158	158
Écart à la moyenne statistique (%).	5	2	3	3,5	3	6	5	5

III. — APPLICATION DE CETTE MÉTHODE

a) *Évolution de la vitalité des spermatozoïdes au cours du temps et à température constante 37°C*

La figure 2 montre que la largeur à mi-hauteur Γ diminue au cours du temps. Au bout de 35 minutes, le spectre obtenu indique que la plupart des spermatozoïdes sont morts.

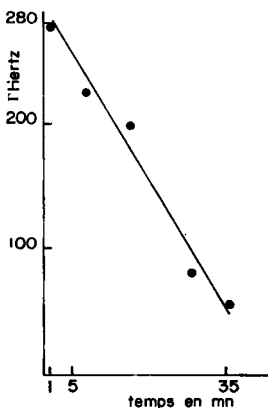


FIG. 2. — *Vieillessement en fonction du temps*
Expérience effectuée avec des échantillons de spermatozoïdes frais,
de concentration $80 \cdot 10^6$ sperm./ml

Ce résultat est en désaccord avec l'observation courante du maintien de la motilité des spermatozoïdes conservés à 37°C pendant plusieurs heures. Ce désaccord ne paraît imputable qu'à l'éclairement par le faisceau laser. Toutefois la rapidité d'une mesure est telle qu'il n'y a pas évolution de la vitalité au cours de celle-ci.

b) *Évolution de la vitalité en fonction de la température*

Chaque mesure est effectuée sur une nouvelle préparation une minute après son introduction dans la cellule, temps nécessaire à l'échantillon pour atteindre l'équilibre thermique. La figure 3 montre que la largeur à mi-hauteur n'évolue pas entre 15° et 18°C. Puis, cette largeur augmente d'un facteur 6 entre 18° et 43°C. Elle reste constante jusqu'à 53°C, température à laquelle les spermatozoïdes meurent en cours de mesure (fig. 4).

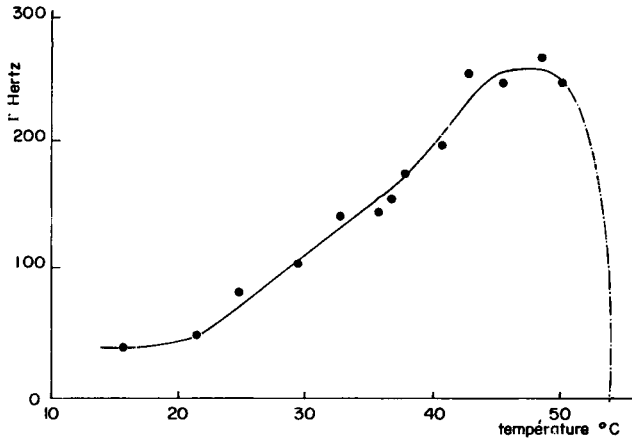


FIG. 3. — *Évolution de la vitalité en fonction de la température*
Expérience effectuée avec des échantillons de spermatozoïdes frais,
de concentration $80 \cdot 10^6$ sperm./ml

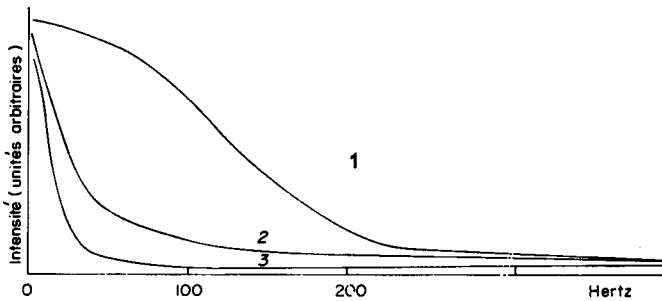


FIG. 4. — *Mort des spermatozoïdes durant le temps de la mesure à 54°C*

- 1) Expérience faite une minute après l'introduction dans la cellule.
- 2) Expérience faite immédiatement après 1). La brusque diminution de la largeur à mi-hauteur entre 1) et 2) révèle la mort des spermatozoïdes.
- 3) Courbe obtenue avec les spermatozoïdes morts.

Des mesures de vitesse en fonction de la température effectuées par RIKMENS-POEL donnent, entre 41° et 33°, un rapport de vitesse égal à 1,32, mesures faites sur douze éjaculats. Le rapport que nous obtenons entre les largeurs à mi-hauteur Γ aux mêmes températures est de 1,57, mesures faites sur un éjaculat seulement.

Par ailleurs, le tableau 2 montre la sensibilité de notre méthode. En effet, nous avons pu vérifier que des spermatozoïdes frais ont une vitalité supérieure à celle de spermatozoïdes conservés à la température de l'azote liquide.

On retrouve le même accord entre les données du test spectroscopique et celles de l'examen microscopique habituel lorsque l'on compare deux éjaculats de qualité différente.

TABLEAU 2

Sensibilité de la méthode

Nombre de spermatozoïdes par ml	Éjaculat frais	Éjaculat congelé	Éjaculat de forte motilité	Éjaculat de faible motilité
C = 40.10 ⁶ C = 80.10 ⁶	$\Gamma = 125$ Hz $\Gamma = 152$ Hz	$\Gamma = 104$ Hz $\Gamma = 142$ Hz	720 Hz	420 Hz

CONCLUSION

Les expériences précédentes montrent que cette technique constitue un moyen de mesure d'utilisation aisée, rapide et objective pour l'étude des mouvements et de la vitalité des microorganismes et pourrait servir à contrôler très rapidement le pouvoir fécondant d'un éjaculat avant usage.

Reçu pour publication en juillet 1969.

SUMMARY

POSSIBLE APPLICATION OF THE INELASTIC LIGHT DIFFUSION TECHNIQUE TO THE ESTIMATION OF BULL SPERM MOTILITY

The light diffused by a soluted population of spermatozoa was spectrographically analyzed by means of the photon beating technique. This physical method enables to compare the « vitality » of various samples. It gives objective, reproducible and accurate results within a fairly short time. Moreover, the movement of spermatozoa is not disturbed during the experiment.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ADAM M., HAMELIN A., BERGÉ P., 1969. Mise au point et étude d'une technique de spectrographie par battements de photons hétérodyne (à paraître dans *Optica Acta*).
- BERGÉ P., VOLOCHINE B., 1967. *C. R. Acad. Sci.*, **264**, série B, 1200.
- RIKMENSPOEL R., 1957. Thèse : *Photoelectric and cinematographic measurements of the « motility » of bull sperm cells.*
- MÜLLER E., 1968. Fotogrammetrische Untersuchungen über die Motilität verdünnter Rinderejulate. *Wien. Tierärztl. Monatsch.*, **55**, 309-324.
- VAN DUIJN C., Jr, 1963. Bevruchtend vermogen van spermatozoa in verband met jun beweglijkheidskenmerken en overlevingsduur. *Schoonoord Rapport N° B 48.*