

27411

## TECHNOLOGIE DE LA CONGELATION DE LA SEMENCE DE VERRAT : ETUDE IN VITRO

*M. PAQUIGNON (2), D. MERGOUNIS (1)\*, M. COUROT  
et F. du MESNIL du BUISSON (1)*

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

*(2) I.T.P. - 149, rue de Bercy - 75579, Paris Cédex 12*

### INTRODUCTION

Une des conditions du succès de l'insémination artificielle porcine avec du sperme congelé est une bonne efficacité de cette méthode.

Le dilueur I.N.R.A. - I.T.P. avec lequel nous avons obtenu des taux de mise-bas convenables donnait un faible taux de spermatozoïdes réanimés (PAQUIGNON et du MESNIL du BUISSON, 1973). Or l'influence du dilueur sur la réanimation a été montrée par CRABO et al., 1972 ; PURSEL, 1972 ; PAQUIGNON et du MESNIL du BUISSON, 1973. La température de glycérolisation est également importante puisqu'une glycérolisation à 5°C donne des résultats significativement supérieurs à une glycérolisation à 30°C (WILMUT et al., 1973). Selon les auteurs, la glycérolisation pour la congélation du sperme de verrat se fait soit à 25°C - 30°C soit à 5°C. Aucune expérience n'a pris en considération une glycérolisation à 15°C température au-dessous de laquelle les spermatozoïdes sont très sensibles au choc thermique. Par ailleurs les vitesses de refroidissement pour amener la semence de 30°C à 5°C varient de 2 h. 30 à 6 h. suivant les publications.

L'objet de notre étude a donc été :

- 1°/ d'essayer d'améliorer le taux de survie après décongélation en choisissant un dilueur mieux adapté,
- 2°/ de déterminer la vitesse de refroidissement et la température de glycérolisation avant congélation les plus favorables pour une meilleure réanimation des spermatozoïdes.

### CONDITIONS EXPERIMENTALES

Après collecte manuelle et filtration sur de la gaze l'éjaculat entier est centrifugé à 28°C - 30°C pendant 15 mn à 1.900 tr/mn (800 g).

- Dans une première étude, le culot partagé en deux est dilué 1 : 2 avec l'un et l'autre des deux dilueurs non glycérolés suivants : dilueur à base de jaune d'œuf, glucose, (POLGE et al., 1970) et dilueur de congélation I.N.R.A. - I.T.P. (PAQUIGNON et du MESNIL du BUISSON, 1973). La semence est refroidie de 28°C à 15°C en 5 heures, puis rediluée avec le même dilueur glycérolé (Taux de glycérol 6 %) (volume dilueur glycérolé = volume dilueur non glycérolé). La température de la semence est alors abaissée de +15°C à 5°C en 1 heure. Le sperme est alors congelé en pastilles. 6 éjaculats ont été utilisés pour ce travail.

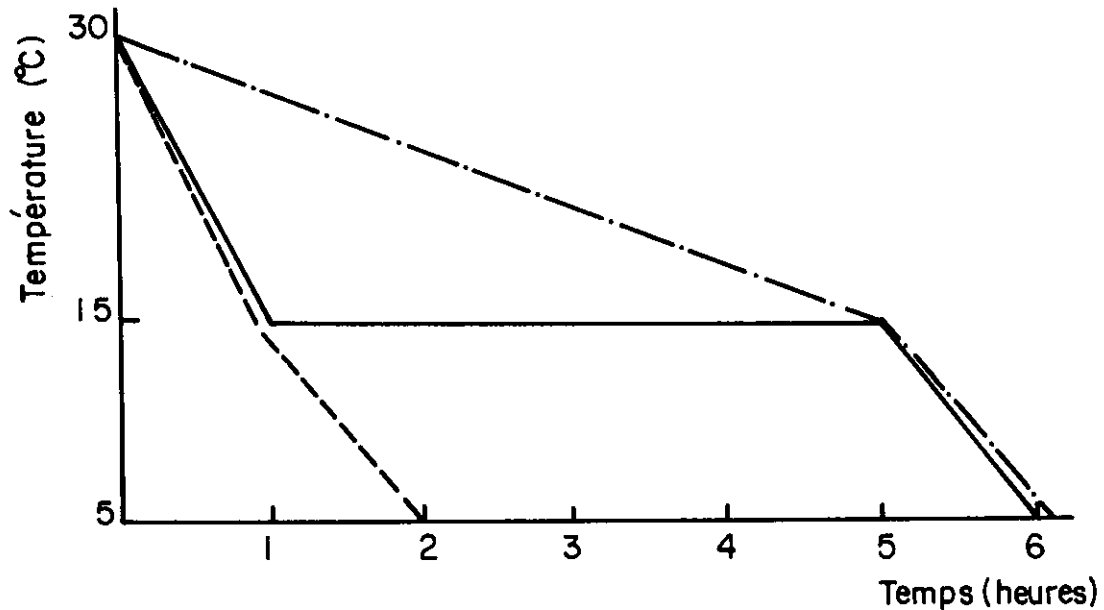
- Dans une seconde, étude le culot est dilué une première fois 1 : 2 avec le dilueur POLGE non glycérolé. La semence est alors soumise à différents traitements selon une expérience factorielle (3 x 3) (graphique 1) faisant intervenir le mode de refroidissement jusqu'à 5°C (A.B.C.) et la température de la glycérolisation (30°C - 15°C - 5°C). La glycérolisation à 15°C pour le traitement B a lieu pour un échantillon après 1 heure et pour l'autre après 5 heures de refroidissement. La deuxième dilution avec le dilueur glycérolé est identique à celle précédemment décrite. Cette expérience a été répétée avec la semence de 4 éjaculats provenant de 3 verrats.

---

\* Adresse actuelle : I.N.R.A. Station Centrale de Physiologie Animale - 78350 Jouy-en-Josas.

FIGURE 1

MODE DE REFROIDISSEMENT ET TEMPERATURE DE GLYCEROLISATION POUR LES DIFFERENTS TRAITEMENTS



— . — mode de refroidissement A  
 — " " " B  
 - - - " " " C

- Pour chaque mode de refroidissement la glycérolisation a lieu de manière comparée aux températures 30°C, 15°C, 5°C.
- Pour le mode B, à 15°C, la glycérolisation a lieu soit après 1 heure, soit après 5 heures de refroidissement.

La congélation a lieu à partir de semence à 5°C pour tous les traitements et de semence à 15°C en plus pour les traitements A et C. Elle est faite en pastilles de 0,1 ml sur de la neige carbonique selon la technique de NAGASE et NIWA (1964). Les échantillons glycérolés à 5°C sont congelés en moins de 50 s ; après 4 mn d'attente sur la neige carbonique les pastilles sont transférées dans de l'azote liquide.

Les pastilles sont décongelées dans le dilueur I.N.R.A. - I.T.P. à 50°C (10 pastilles pour 5 ml de dilueur). Les examens des différents échantillons se font au hasard 5 mn et 3 heures après la décongélation.

## RESULTATS

### • Expérience I :

Le pourcentage de spermatozoïdes vivants obtenu après décongélation avec le dilueur POLGE est significativement supérieur à celui obtenu avec le dilueur I.N.R.A. - I.T.P. (26,1 % contre 16,6 % (tableau 1)).

TABLEAU 1

INFLUENCE DU DILUEUR UTILISE SUR LE POURCENTAGE DE SPERMATOZOIDES VIVANTS APRES DECONGELATION ET APRES 3 HEURES D'INCUBATION

| DILUEURS             | MOMENT D'EXAMEN DU SPERME | APRES DECONGELATION | APRES 3 HEURES D'INCUBATION | TAUX DE CHUTE |
|----------------------|---------------------------|---------------------|-----------------------------|---------------|
| POLGE .....          |                           | 26,11               | 16,66                       | 36 %          |
| I.N.R.A./I.T.P. .... |                           | 13,6                | 9,83                        | 27 %          |

n = 6 ; \* significatif au seuil de 5 %.

Après 3 heures d'incubation le dilueur Polge est toujours supérieur. Cependant la différence entre les deux dilueurs n'est plus significative ; en effet la chute de survie avec le dilueur POLGE est plus importante qu'avec le dilueur I.N.R.A. - I.T.P. (36 % contre 27 %).

#### • Expérience II :

La glycérolisation à 15°C après 1 heure ou 5 heures de refroidissement B) n'a aucune influence significative sur le pourcentage de spermatozoïdes vivants avant congélation (60,4 % dans les deux cas) après décongélation (24,9 % contre 25,9 %) et après 3 heures d'incubation à 37°C (19,2 % contre 19,7 %).

Dans l'analyse statistique globale de l'expérience factorielle, nous avons pris en considération pour la vitesse de refroidissement B la glycérolisation à 15°C après 5 heures de refroidissement.

Cette analyse (tableau 2) indique que la vitesse de refroidissement et la température de glycérolisation (sauf pour le pourcentage de vivant après 3 heures d'incubation) ont une influence significative sur le pourcentage de spermatozoïdes vivants aux différents moments d'examen du sperme. Avant congélation la température de glycérolisation a plus d'influence que la vitesse de refroidissement, après décongélation l'effet est inversé et après incubation seule la vitesse de refroidissement a encore un effet significatif. Il n'y a aucune interaction entre les différents traitements.

**TABEAU 2**  
ETUDE DU POURCENTAGE DE SPERMATOZOÏDES VIVANTS,  
ANALYSE DE VARIANCE F POUR LES DIFFÉRENTS TRAITEMENTS

| MOMENT D'EXAMEN DU SPERME \ SOURCE DE VARIATION | TRAITEMENT | VITESSE DE REFOUÏDISSEMENT | TEMPERATURE DE GLYCÉROLISATION | INTER-ACTION |
|---|------------|----------------------------|--------------------------------|--------------|
| Avant congélation .....                         | 5,19 **    | 4,23 *                     | 12,10 **                       | 2,21         |
| Après décongélation .....                       | 2,76 **    | 7,22 **                    | 3,47 *                         | 0,18         |
| Après 3 heures d'incubation .....               | 2,95 **    | 9,77 **                    | 0,47                           | 0,79         |

\* P < 0,05

\*\* P < 0,01

La comparaison des moyennes à l'aide du test (tableau 3) indique qu'avant congélation une glycérolisation à 5°C et congélation immédiate donnent des résultats significativement inférieurs (P ≤ 0,05) à une glycérolisation à 15°C ou 30°C (52,7 % contre 61,2 % et 61,1 %). Après décongélation, une glycérolisation à 15°C donne un pourcentage de spermatozoïdes réanimés significativement supérieur à une glycérolisation à 5°C (23,4 % contre 19,7 %). Une glycérolisation à 30°C n'est pas significativement différente des deux autres. Après 3 heures d'incubation, il n'y a aucune influence du moment de la glycérolisation.

Voir page suivante : tableau 3

Une vitesse de refroidissement rapide avant congélation (C) donne un résultat significativement supérieur aux deux autres (P ≤ 0,05) (61,6 contre 56,3 et 57 %). Après décongélation et incubation, c'est la vitesse de refroidissement B qui donne des résultats significativement supérieurs (P ≤ 0,05) (24,1 % contre 21,4 % et 18,3 %) et (17,6 % contre 13,5 % et 11,5 %).

Une congélation à partir de semence à 15°C est significativement inférieure (P ≤ 0,01) à une congélation à partir de semence à 5°C (12,1 % contre 21,9 %).

## DISCUSSION

L'augmentation du taux de spermatozoïdes réanimés avec le dilueur POLGE dans l'expérience I permet d'améliorer sensiblement le rendement de la méthode en permettant d'inséminer 1 ou 2 truies en plus par éjaculat.

TABLEAU 3

INFLUENCE DE LA VITESSE DE REFROIDISSEMENT ET DU MOMENT DE LA GLYCEROLISATION  
SUR LE POURCENTAGE DE SPERMATOZOIDES MOBILES APRES DIFFERENTS TRAITEMENTS

| TRAITEMENTS                    | % de SPERMATOZOIDES VIVANTS AVANT CONGELATION |                                |                                |                   | % de SPERMATOZOIDES VIVANTS APRES DECONGELATION |                                 |                                 |                   | % de SPERMATOZOIDES VIVANTS APRES 3 HEURES D'INCUBATION |                                |                                 |                   |  |
|--------------------------------|---|--------------------------------|--------------------------------|-------------------|---|---------------------------------|---------------------------------|-------------------|---|--------------------------------|---------------------------------|-------------------|--|
|                                | 30  | 15                             | 5                              | $\bar{m}$         | 30  | 15                              | 5                               | $\bar{m}$         | 30  | 15                             | 5                               | $\bar{m}$         |  |
| TEMPERATURE DE GLYCEROLISATION |   |                                |                                |                   |   |                                 |                                 |                   |   |                                |                                 |                   |  |
| VITESSE DE REFROIDISSEMENT     |   |                                |                                |                   |   |                                 |                                 |                   |   |                                |                                 |                   |  |
| A .....                        | 61,2 <sup>a</sup> <sub>c</sub>                | 61,2 <sup>a</sup> <sub>c</sub> | 48,7 <sup>b</sup> <sub>d</sub> | 57,0 <sup>b</sup> | 19,3 <sup>a</sup> <sub>c</sub>                  | 20,9 <sup>b</sup> <sub>c</sub>  | 16,2 <sup>b</sup> <sub>c</sub>  | 18,3 <sup>b</sup> | 11,3 <sup>b</sup> <sub>c</sub>                          | 12,8 <sup>b</sup> <sub>c</sub> | 10,2 <sup>b</sup> <sub>c</sub>  | 11,5 <sup>b</sup> |  |
| B* .....                       | 60,0 <sup>a</sup> <sub>c</sub>                | 60,4 <sup>a</sup> <sub>c</sub> | 48,7 <sup>b</sup> <sub>d</sub> | 56,3 <sup>b</sup> | 23,5 <sup>a</sup> <sub>c</sub>                  | 25,9 <sup>a</sup> <sub>c</sub>  | 23,0 <sup>a</sup> <sub>c</sub>  | 24,1 <sup>a</sup> | 16,7 <sup>a</sup> <sub>c</sub>                          | 19,7 <sup>a</sup> <sub>c</sub> | 16,5 <sup>a</sup> <sub>c</sub>  | 17,6 <sup>a</sup> |  |
| C .....                        | 62,0 <sup>a</sup> <sub>c</sub>                | 62,0 <sup>a</sup> <sub>c</sub> | 60,8 <sup>a</sup> <sub>c</sub> | 61,6 <sup>a</sup> | 20,8 <sup>a</sup> <sub>c</sub>                  | 23,5 <sup>ab</sup> <sub>c</sub> | 20,0 <sup>ab</sup> <sub>c</sub> | 21,4 <sup>b</sup> | 13,9 <sup>ab</sup> <sub>c</sub>                         | 12,9 <sup>b</sup> <sub>c</sub> | 13,8 <sup>ab</sup> <sub>c</sub> | 13,5 <sup>b</sup> |  |
| $\bar{m}$ .....                | 61,1 <sup>c</sup>                             | 61,2 <sup>c</sup>              | 52,7 <sup>d</sup>              | 58,3              | 21,2 <sup>cd</sup>                              | 23,4 <sup>c</sup>               | 19,7 <sup>d</sup>               | 21,5              | 14,0 <sup>c</sup>                                       | 15,1 <sup>c</sup>              | 13,5 <sup>c</sup>               | 14,2              |  |

N = 12

Les moyennes non suivies verticalement (a,b) ou horizontalement (c,d) de la même lettre, sont significativement différentes.

Pour le mode B avec la glycérolisation à 15°C, on a seulement retenu les valeurs pour lesquelles la glycérolisation est réalisée au bout de 5 heures de refroidissement.

L'influence de la température de glycérolisation (expérience II) sur les résultats de survie après décongélation semblent en contradiction avec ceux obtenus par WILMUT et al., 1973. Pour ces auteurs une glycérolisation à 5°C quelle que soit la durée d'équilibration donne un pourcentage de spermatozoïdes réanimés supérieur à une glycérolisation à 30°C. Dans le cas où la glycérolisation se fait à 30°C ou à 15°C, la durée de contact avec le glycérol est de 6, 5, 2 ou 1 heure, or pour WILMUT et al. (1973), de faibles temps de contact "spermatozoïdes - dilueur glycérolé" 5-20 s, 30 s, 5-10 mn nécessitent de plus forte concentration de glycérol, respectivement 8, 6 et 4 % pour obtenir une protection maximum. Les 2,4 % de glycérol final employé dans notre expérience sont certainement trop faibles pour une durée de contact inférieure à 50 s. C'est peut-être pourquoi une glycérolisation à 15°C qui permet une équilibration d'une heure donne les meilleurs résultats dans notre expérience.

Quelles que soient les vitesses de refroidissement employées de 30°C à 5°C, celle de 15°C à 5°C est constante et égale à 1 heure. Les variations que l'on peut donc trouver entre ces différentes vitesses de refroidissement sont dues aux variations de traitement avant 15°C. Les travaux de ROHLOFF et ALLMELING (1972) montrent qu'une vitesse de refroidissement de 25°C à 5°C en 2 heures comparée à une vitesse de refroidissement de 5 heures améliore de 13 % le pourcentage de spermatozoïdes réanimés (63,5 % contre 50 %). Ceci pourrait expliquer les meilleurs résultats obtenus dans notre expérience avec une vitesse de refroidissement rapide au départ 30°C à 15°C en 1 heure. D'autre part la différence significative obtenue dans le taux de survie entre les traitements B et C peut être expliquée par le maintien à 15°C (avec ou sans glycérol) pendant 5 heures que subit le traitement B. En effet une incubation de 5 heures comparée à une incubation d'une heure améliore le taux de spermatozoïdes mobiles après choc thermique (PURSEL et al., 1972).

La congélation à partir de semence à 15°C semble une limite supérieure au-delà de laquelle le taux de spermatozoïdes réanimés après décongélation est fortement réduit. En effet une congélation à partir de semence à 4°C ou 12°C donne des résultats identiques (30,6 % et 32,7 %) par contre une congélation à partir de semence à 22°C abaisse le taux de réanimé (12 %) (GRAHAM et CRABO, 1972).

## CONCLUSION

L'utilisation du dilueur POLGE comme milieu de congélation et l'emploi d'une vitesse de refroidissement rapide au départ nous permettent donc d'améliorer d'une façon très sensible l'efficacité de cette nouvelle méthode de congélation.

Des inséminations sont en cours afin de tester la fécondance du sperme préparé selon ces méthodes.

Les premiers résultats sont encourageants, bien que de nombreux problèmes restent à résoudre : sur 9 truies inséminées, à un moment très précis de l'oestrus, avec du sperme congelé (traitement B), 8 ont été gestantes.

Le rendement de la méthode est encore faible ; des recherches sont en cours pour voir si une modification de la concentration en spermatozoïdes au moment de la congélation et un changement du taux de glycérol dans le dilueur permettraient de l'améliorer.

## REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé grâce à un financement du FORMA, versé au titre d'une convention passée entre cet organisme, l'I.T.P. et l'I.N.R.A. dans le cadre du programme de rationalisation de la Production Porcine.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- CRABO B., EINARSSON S., LAMM A.M., SOOSALU O., VIRING S. 1972 - VIIe Cong. Int. Reprod. Anim. Insem. Artif., Munich, 2, 1649-1651.
- GRAHAM E.F., CRABO B.G., 1972. VIIe Cong. Int. Repro. Anim. Insem. Artif., Munich, 2, 1629-1632.

- NAGASE H., NIWA T., 1964.  
Ve Cong. Int. Reprod. Anim. Insem. Artifi., Trente, 4, 410-415.
- PAQUIGNON M., du MESNIL du BUISSON F., 1973.  
Journées de la Recherche Porcine en France, 49-57.
- POLGE C., SALAMON S., WILMUT I., 1970.  
Vet. Rec., 87, 424-428.
- PURSEL V.G., JOHNSON L.A., RAMPACEK G.B., 1972.  
J. Anim. Sci., 34, 278-283.
- PURSEL V.G., JOHNSON L.A., 1972.  
J. Anim. Sci., 35, 1123 (Abst.).
- ROHLOFF D., ALLMELING G., 1972.  
Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift 17, 330-332.
- WILMUT I., SALAMON S., POLGE C., 1973.  
Aust. J. Biol. Sci. 26, 231-237.