

R7702

EFFET DE DIFFERENTES SOLUTIONS DE DECONGELATION SUR LE POUVOIR FECONDANT DES SPERMATOZOIDES DE VERRAT

PAQUIGNON M. (1), DACHEUX J.L. (2), COUROT M. (3) *

(1) I.T.P. - 149, rue de Bercy - 75579 Paris XII

(2) Laboratoire de Physiologie Comparée, Faculté des Sciences - 37200 Tours

(3) I.N.R.A. - Station de Physiologie de la Reproduction - 37380 Monnaie

INTRODUCTION

Le nombre de spermatozoïdes mobiles atteignant le site de fécondation est un des facteurs essentiels de réussite de la reproduction. Il dépend en partie de leur survie et de leur motilité individuelle au cours de leur transport dans le tractus génital femelle (HUNTER, 1973). Ainsi, une meilleure survie *in vitro* de spermatozoïdes décongelés et incubés à 37°C est associée à une meilleure fécondance (PAQUIGNON & COUROT, 1975a), et l'insémination de spermatozoïdes faiblement motiles après décongélation dans la solution INRA-ITP s'accompagne d'une fertilité et prolificité convenables mais légèrement inférieures à celles obtenues avec de la semence fraîche (PAQUIGNON et al., 1976a). Or, différents inhibiteurs des phosphodiesterases: caféine, théophylline, stimulent la mobilité et la consommation d'oxygène, tout en préservant le maintien de la survie après incubation, des spermatozoïdes éjaculés de taureaux (GARBERS et al., 1971) et d'hommes (SCHOENFELD et al., 1973).

L'objet de notre étude a été d'étudier l'effet éventuel de la caféine ajoutée dans la solution de décongélation INRA-ITP (PAQUIGNON et COUROT, 1976b) sur la fécondance des spermatozoïdes et de comparer les résultats à ceux obtenus avec la solution de décongélation BTS (PURSEL et al., 1976).

MATERIEL ET METHODE

6 verrats Large-White et 1 Piétrain sont collectés régulièrement chaque semaine. La semence est congelée selon la technique mise au point dans notre laboratoire (PAQUIGNON & COUROT, 1975) de telle sorte que chaque éjaculat produise un multiple de trois doses. Celles-ci sont décongelées à 50°C dans trois solutions différentes: INRA-ITP, INRA-ITP + 0,6 mM de caféine et BTS à raison de 1 volume de semence congelée pour 5 volumes de solution de décongélation.

La qualité de la semence est appréciée au microscope à contraste de phase par la motilité (notée de 0 à 5) et le pourcentage de spermatozoïdes mobiles au dégel et après 3 heures d'incubation à 37°C.

Une électrode à oxygène permet de contrôler l'évolution de la consommation d'oxygène des spermatozoïdes décongelés et incubés dans la solution INRA-ITP avec ou sans caféine. Les résultats sont exprimés par le pourcentage d'augmentation de consommation d'oxygène provoqué par la caféine.

Les inséminations sont réalisées par pression à l'aide de la sonde MELROSE 10 à 15 mn après dégel en injectant 30 ml de solution de décongélation avant et après la semence. Au fur et à mesure de leur venue en oestrus manifesté par le réflexe d'immobilisation, 155 truies nullipares sont réparties en 3 lots différents selon la solution de décongélation utilisée. Elles sont inséminées une seule fois 24 à 35 heures après le début des chaleurs avec $3 \cdot 10^9$ spermatozoïdes vivants. Les truies qui ne sont pas revenues en oestrus ont été abattues 60 à 90 jours après l'insémination,

RESULTATS

1/ Motilité et pourcentage de spermatozoïdes mobiles au dégel et après 3 heures d'incubation (tableau 1)

Au dégel la caféine additionnée à la solution INRA-ITP améliore significativement le taux de spermatozoïdes mobiles (22,98 % contre 20,80 %) ($P \leq 0,01$) et leur motilité (4,10 contre 3,49) ($P \leq 0,01$). La

* Avec la collaboration technique de J. GAUTIER.

solution BTS n'améliore pas le taux de spermatozoïdes vivants mais accroît significativement leur motilité (4,31 contre 3,49) ($P \leq 0,01$). Après 3 heures d'incubation, la solution INRA-ITP maintient significativement mieux la survie des spermatozoïdes que cette solution additionnée de caféine ou que le BTS (18,72 % contre 16,8 et 12,8 %) ($P \leq 0,01$). Il en est de même pour la motilité (3,57 contre 3,78 et 3,77) ($P \leq 0,01$). Ainsi, la diminution du taux de spermatozoïdes mobiles et de leur motilité en cours d'incubation est plus importante après addition de caféine dans la solution INRA-ITP.

TABLEAU 1

EFFET DE DIFFERENTES SOLUTIONS DE DECONGELATION SUR LE TAUX DE SPERMATOZOIDES MOBILES ET LEUR MOTILITE APRES 0 ET 3 HEURES D'INCUBATION A + 37°C

SOLUTION DE DECONGELATION	% de SPERMATOZOIDES MOBILES ($m \pm s_m$)		MOTILITE INDIVIDUELLE ($m \pm s_m$)			
	0 h		3 h	0 h	3 h	
INRA-ITP	20,80 \pm 0,41 _a	— —	18,72 \pm 0,60 _a	3,49 \pm 0,03 _a	NS	3,57 \pm 0,04 _a
INRA-ITP caféine	22,98 \pm 0,46 _b	— —	16,80 \pm 0,59 _b	4,10 \pm 0,04 _b	— —	3,78 \pm 0,04 _b
BTS	22,00 \pm 0,58 _{ab}	— —	12,83 \pm 0,71 _c	4,31 \pm 0,04 _b	— —	3,77 \pm 0,05 _b

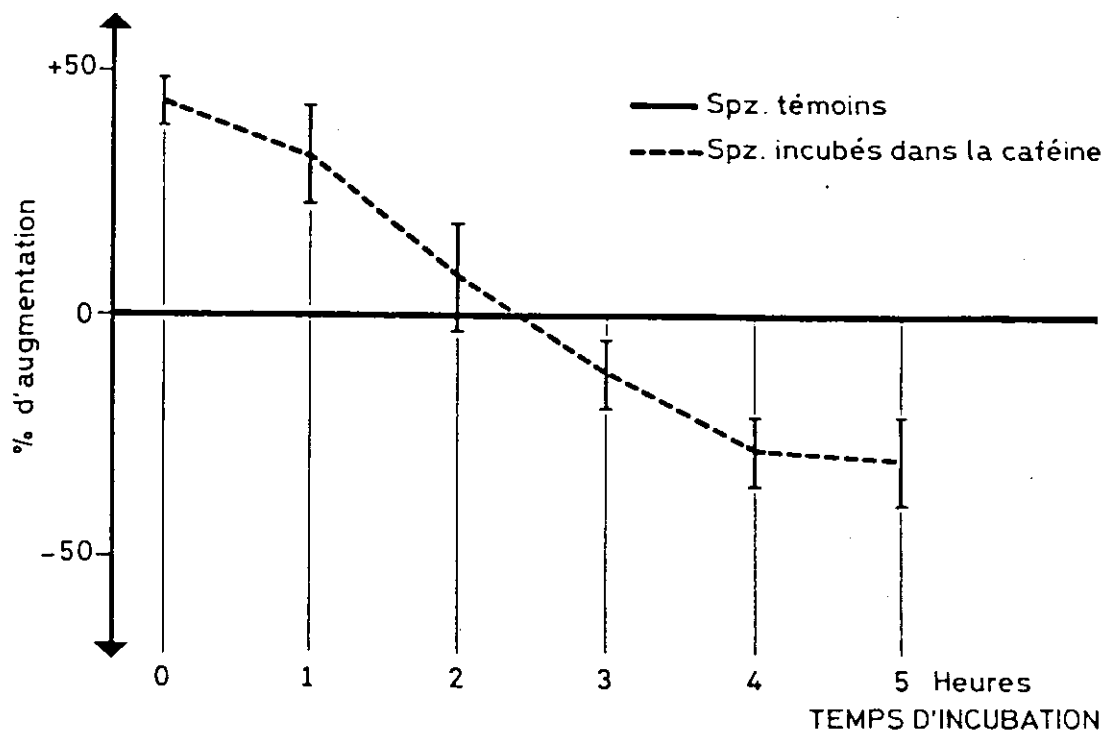
- Les moyennes non suivies verticalement de la même lettre sont significativement différentes ($P \leq 0,01$).
- — Différence significative ($P \leq 0,01$) (entre valeurs horizontales).

2/ Consommation d'oxygène (Graphique 1)

Au dégel les spermatozoïdes décongelés dans la solution INRA-ITP additionnée de caféine ont une augmentation de consommation d'oxygène supérieure de 44 % à ceux décongelés dans la solution INRA-ITP seule. Cet effet est transitoire, il disparaît après 2 h. 30 d'incubation et devient négatif par la suite : - 12 % et - 30 % après 3 et 5 heures d'incubation.

GRAPHIQUE 1

EFFET DE L'ADDITION DE CAFEINE (0,6 mM) DANS LA SOLUTION INRA-ITP SUR L'AUGMENTATION DE LA CONSOMMATION D'O₂



3/ Fertilité et survie embryonnaire (tableau 2)

Le taux de gestation et la survie embryonnaire ne sont pas significativement améliorés par l'addition de caféine dans la solution INRA-ITP (66,0 % contre 60,7 % ; 69,9 % contre 73,4 %). L'utilisation de la solution INRA-ITP avec et sans caféine comparée à la solution BTS améliore significativement le taux de gestation (63,4 % contre 45 %) ($P \leq 0,01$). Il en est de même pour la survie embryonnaire (73,4 % et 69,9 % contre 56,4 %) ($P \leq 0,01$). Le taux de retours anormaux avec la solution BTS est de 2 à 5 fois supérieurs à celui obtenu respectivement avec la solution INRA-ITP avec et sans caféine.

TABLEAU 2

EFFET DES DIFFERENTES SOLUTIONS DE DECONGELATION SUR LA FERTILITE ET LA SURVIE EMBRYONNAIRE

SOLUTIONS DE DECONGELATION	TAUX DE GESTATION (%)	NOMBRE D'EMBRYONS ($m \pm s_m$)	NOMBRE DE CORPS JAUNES ($m \pm s_m$)	SURVIE EMBRYONNAIRE (%)	TAUX DE RETOURS ANORMAUX 25 jours (%)	
INRA-ITP (51)	$P \leq 0,01$	60,7 _a	8,16 ± 0,52 _a	11,06 ± 0,30	73,4 _a	5
INRA-ITP caféine (53)		66,0 _a	8,60 ± 0,48 _a	12,08 ± 0,32	69,9 _a	11
BTS (51)		45,0 _a	6,65 ± 0,48 _b	11,78 ± 0,48	56,4 _b	25

— Les moyennes non suivies verticalement de la même lettre sont significativement différentes ($P \leq 0,01$).

— Les taux de gestation obtenus avec le dilueur INRA-ITP (avec et sans caféine) sont significativement différents de ceux obtenus avec BTS ($P \leq 0,01$).

() Nombre de femelles inséminées.

DISCUSSION

La solution INRA-ITP additionnée de caféine améliore significativement au dégel et après 3 heures d'incubation la motilité des spermatozoïdes comparée à celle obtenue avec la solution INRA-ITP seule. Le mode d'action de la caféine n'est pas encore bien élucidé. Elle pourrait bloquer la dégradation de l'A.M.P. cyclique qui agirait par l'intermédiaire des protéines kinases sur les éléments contractiles du flagelle (HARRISON, 1975). Le pourcentage de spermatozoïdes mobiles et la consommation d'oxygène sont également améliorés au dégel. Cependant, après 3 heures d'incubation, les chutes du pourcentage de spermatozoïdes mobiles et de la consommation d'O₂ sont plus importantes après l'addition de 0,6 mM de caféine dans la solution INRA-ITP. Ceci est en contradiction avec les résultats obtenus avec des spermatozoïdes bovins (GARBERS et al., 1971) et humains (SCHOENFELD et al., 1973). L'effet dépressif que nous observons sur le sperme de verrat est dû à la caféine et non aux altérations des spermatozoïdes après congélation, car ce phénomène est aussi observé sur du sperme frais (DACHEUX, 1976). Les spermatozoïdes de verrats semblent donc plus sensibles que ceux des autres espèces à la stimulation de leur métabolisme. Cependant, le taux de gestation et la survie embryonnaire ne sont pas affectés. Une motilité supérieure doit compenser la plus forte chute du pourcentage de spermatozoïdes mobiles et de la consommation d'O₂ après 3 heures d'incubation quand la caféine est additionnée à la solution de décongélation. Il n'en est pas de même avec la solution BTS dans laquelle on observe une chute de 45 % du taux de spermatozoïdes mobiles après 3 heures d'incubation. Cette forte baisse de la survie est probablement à l'origine de la diminution significative du taux de gestation et de la survie embryonnaires remarquée avec le BTS. Nous avons en effet montré qu'une mauvaise survie *in vitro* est associée à une moins bonne fécondance (PAQUIGNON et COUROT, 1975a).

Ce taux de gestation et de survie embryonnaire obtenus avec la solution BTS dans nos conditions de congélation ne confirment pas ceux de PURSEL et al. (1976), et de POLGE (1976) qui obtenaient un taux de conception et d'oeufs fécondés, 24 heures après insémination, respectivement, de 70 à 80 % et 80 %. Le taux

élevé de retours anormaux avec le BTS suggère l'existence d'une mortalité embryonnaire précoce importante. Nos observations confirment cette remarque car la survie embryonnaire est plus faible de 17 % avec la solution BTS comparée à la solution INRA-ITP. Le jugement de l'efficacité d'une technique de congélation doit donc tenir compte du moment de l'appréciation des résultats.

CONCLUSION

L'addition de 0,6 mM de caféine dans la solution de décongélation INRA-ITP n'a pas d'effet sur le taux de gestation et la survie embryonnaire. Toutefois, la diminution de la stimulation de consommation d'O₂ au cours de l'incubation montre une forte sensibilité des spermatozoïdes de verrat à une modification de leur métabolisme. Des doses plus faibles de caféine devront être testées. La solution de décongélation BTS comparée à celle INRA-ITP provoque une diminution de la fertilité et de la survie embryonnaire par suite d'une forte chute de la survie des spermatozoïdes.

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé grâce au financement du F.O.R.M.A. versé au titre d'une convention passée entre cet organisme, l'ITP et l'INRA dans le cadre du programme de rationalisation de la production porcine.

BIBLIOGRAPHIE

- DACHEUX J.L., 1976. Communication personnelle.
- GARBERS D.L., FIRST N.L., SULLIVAN J.J., LARDY H.A., 1971. Stimulation and maintenance of ejaculated bovine spermatozoa respiration and motility by caffeine. *Biol. Reprod.*, **5**, 336-339.
- HARRISON R.A.P., 1975. Aspects of the enzymology of mammalian spermatozoa. The biology of the male gamete : Duckett J.G. Racey P.A., 301-316. Academic Press London U.K.
- HUNTER R.H.F., 1973. Transport, migration and survival of spermatozoa in the female genital tract : species with intra-uterine deposition of semen *INSERM*, **26**, 309-342.
- PAQUIGNON M., COUROT M., 1975a. Fertilité et prolificité de truies inséminées avec du sperme congelé. *Ann. Zootech.*, **24**, 645-650.
- PAQUIGNON M., COUROT M., 1975b. Survie des spermatozoïdes de verrat après décongélation, effet du rythme de collectes, de la concentration et du taux de glycérol. *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.*, **15**, (3), 517-523.
- PAQUIGNON M., DELAHAYE C., BUSSIÈRE J., COUROT M., 1976. Fertilité et prolificité de truies inséminées avec du sperme congelé : effet du moment de l'insémination. *Journées Rech. Porcine en France*, 181-184.
- PAQUIGNON M., COUROT M., 1976b. Fertilizing capacity of frozen boar spermatozoa. VIIIth Int. Cong. Anim. Repro. Art. Insem., Krakow (in press).
- POLGE C. 1976. The Fertilizing capacity of boar spermatozoa following freezing and thawing. VIIIth Int. Cong. Anim. Repro. Art. Insem., Krakow (in press).
- PURSEL V.G., JOHNSON L.A. 1976. Frozen boar spermatozoa : methods of thawing pellets. *J. Anim. Sci.*, **42**, (4), 927-931.
- SCHOENFELD C.Y., AMELAR R., DUBIN L., 1973. Stimulation of ejaculated human spermatozoa by caffeine. A preliminary report. *Fert. Steri.*, **24**, (10), 772-775.