

## FERTILITE ET PROLIFICITE DE TRUIES INSEMEES AVEC DU SPERME CONGELE

### COMPARAISON DE DEUX DILUEURS. RESULTATS PRELIMINAIRES

*M. PAQUIGNON (1) et F. du MESNIL du BUISSON (2) \**

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

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

#### INTRODUCTION

L'étude de la congélation du sperme de verrat remonte à une quinzaine d'années. Le taux de spermatozoïdes mobiles après décongélation, variable suivant les auteurs et les techniques, était souvent satisfaisant. ROY (1955) annonçait 50 %, POLGE (1956) 26 %, HOFFMAN (1959) 60 %, ROHLOFF (1967) 45 %, DALRYMPLE et Mc PHERSON (1969) 36 %. Inversement, le taux de mise-bas après décongélation était extrêmement faible : Une mise-bas sur 11 truies inséminées (HOFFMAN, 1959), 3 portées sur 43 inséminations (BAIER, 1962) et récemment 4 œufs fécondés sur 221 (PURSEL et al, 1969).

Cependant, après la mise en évidence du maintien du pouvoir fécondant du sperme congelé en inséminant directement dans l'oviducte par voie chirurgicale (POLGE et al., 1970), d'importants progrès ont été réalisés, aboutissant à la mise en place de la semence par voie cervicale (PURSEL et al., 1971a, 1972) ; (CRABO et al., 1971, 1972) ; (GRAHAM et al., 1971a) ; (RICHTER et LIEDICKE, 1972) ; (EINARSSON et al., 1972).

*TABLEAUX I et II : voir pages suivantes*

Nos travaux ont consisté à mettre au point un dilueur que nous avons comparé au dilueur HULSENBERG dans des conditions proches de celles proposées par RICHTER et LIEDICKE (1972).

#### METHODE

La technique s'inspire, pour le début de la manipulation du sperme jusqu'à la congélation, de nos travaux antérieurs et pour la congélation proprement dite de ceux de GRAHAM et al. (1971a) et de PURSEL et JOHNSON (1971a).

##### a) Congélation

Après collecte manuelle et filtration du sperme sur de la gaze, l'éjaculat entier est partagé en deux. Chaque partie est diluée à 1/3 à 34°C soit avec le dilueur INRA-ITP soit avec le dilueur HULSENBERG. La semence est refroidie de 34°C à 15°C en 5 heures puis centrifugée à 1.500 tr/mn pendant 10 mn. Le culot qui est crémeux est dilué dans le rapport 1/1,5 dans un milieu de composition suivante : dilueur de base 72 %, jaune d'œuf 16 %, eau distillée 8 %, Glycérol 4 %, auquel est additionné 6,4 % de poudre de lait écrémé. La température de la semence est abaissée de 15°C à 5°C en 1 heure. La congélation a lieu en "pellet" de 0,07 à 0,08 ml sur de la glace carbonique selon la technique de NAGASE et NIWA (1964). Après 4 mn d'attente, les "pellets" sont transférés dans des visotubes baignant dans de l'azote liquide.

##### b) Décongélation et insémination

Les 300 "pellets" habituellement utilisés pour une insémination sont décongelés à raison de 100 pellets dans 30 ml du premier dilueur à 50°C. La température finale de décongélation est de 19 à 20°C. 6 verrats Large -

---

\* Avec la collaboration technique de A. LOCATELLI et J. GAUTIER

TABLEAU 1

DIFFERENTES TECHNIQUES DE CONGELATION UTILISEES ACTUELLEMENT DANS LE MONDE

AUTEURS	DILUEURS UTILISES	MOMENT DES CENTRIFUGATIONS	MOMENT DE L'ADD. DU DILUEUR GLYCEROLE	TEMPERATURE ET DUREE DE CONTACT AVEC DILUEUR GLYCEROLE	TEMPERATURE ET DUREE DE CONTACT AVEC DILUEUR NON GLYCEROLE	TAUX DE GLYCEROL A LA CONGELATION
POLGE et al., 1970	Glucose jaune d'œuf	Néant	Collecte	30°C → 5°C 2 h 1/2	Néant	3,0 %
CRABO et EINARSSON, 1971 CRABO et al, 1972	TES - Glucose jaune d'œuf	Néant	Néant	30°C → 5°C ?	Néant	< 2,0 %
PURSEL et JOHNSON, 1971a	Fructose - Lactose Caséine - Acide Citrique - Tris Antibiotiques	a) collecte b) 5°C	après 1ère centrifugation 25°C	25°C → 5°C 5 h	5°C, 5 mn après 2ème centrifugation	Traces
GRAHAM et al, 1971a	TES - TRIS Citr. de sodium Fructose - jaune d'œuf	Néant	après 2 heures d'attente : 22°C	22°C → 5°C 2 h	0 ou 2 h	0,0 % 0,5 % 3,0 %
RICHTER et LIEDICKE, 1972	Hülsenberg	15°C	15°C	15°C → 5°C 3/4 h	34°C → 15°C 5 h	2,4 %
EINARSSON et al, 1972	TES Na-K Glucose jaune d'œuf	Néant	Collecte	30°C → 5°C ?	Néant	< 2,0 %

TABLEAU 2

TAUX DE FERTILITE ET PROLIFICITE DES TRUIES INSEMEES AVEC DU SPERME CONGELE  
SELON LES METHODES PRECEDENTES

AUTEURS	MODE DE DECONGELATION	TAUX DE GLYCEROL A LA DECONGELATION	TAUX DE SURVIE	NOMBRE DE SPZ INSEMINES/I.A.	VOIE D'INSEMINATION	TAUX DE FERTILITE (1)	PROLIFICITE MOYENNE
POLGE et al, 1970	37°C	3 %	30-40 %	32.10 <sup>9</sup> 100 à 1000.10 <sup>6</sup> 8 à 37.10 <sup>6</sup>	Cervix Uterus oviducte	0 (0/11)  (6/9)	2,8 % œufs féc. 7,5 (N)
CRABO et EINARSSON, 1971	Plasma séminal (testicules hypoplastiques) 37°C	très faible	30 %	2.5.10 <sup>9</sup> (2 I.A)	Cervix	90,9 % (10/11)	12,0 (N)
CRABO et al, 1972	— Plasma séminal (vasectomisé) TES - Glucose	— — —	— — —	— — —	— — —	84,2 % (16/19) 37,5 % ( 3/8 ) 0 % ( 0/5 )	12 (N), 14,5 (M) 6,7 (N) 7,0 (N)
PURSEL et JOHNSON, 1971, 1972	Poêle 37°C	Traces	5-20 %	20.10 <sup>9</sup> Totaux — —	— —	64,3 % (15/23) 61,4 % (35/57)	11,7 (N) 8,0 (N)
GRAHAM et al, 1971a	Poêle 65°C	0 % 0,5 % 3 %	40 % 45 % 48 %	2,5.10 <sup>9</sup> 2,5.10 <sup>9</sup> 2,5.10 <sup>9</sup>	— — —	45,8 % (11/24) 15,4 % ( 4/26) 0 % ( 0/26)	8,25 (N), 8,5 (M) 6,3 (M)
RICHTER, 1972 et LIEDICKE	Dilueur Hülsenberg 50°C	< 0,5 %	50-60 %	—	—	80,0 %	7,6 (M)
EINARSSON et al, 1972	Lait écrémé 37°C	très faible	50 %	2,5.10 <sup>9</sup> (2 I.A)	—	81,8 % ( 9/11)	6,0 (N)

(1) Nombre de truies gestantes  
Nombre de truies inséminées

N = Nullipares  
M = Multipares

White ont été utilisés (18 éjaculats), 33 truies nullipares Large White furent inséminées 1 seule fois 27 à 29 heures après la mise en évidence du début de l'oestrus (contrôle de l'oestrus biquotidien à 8 et 17 h.), 18 truies avec le dilueur INRA-ITP, 15 truies avec le dilueur HULSENBERG. Chaque couple de truies inséminé avec le même éjaculat recevait le même nombre de spermatozoïdes vivants soit 4 à  $7.10^9$  spermatozoïdes mobiles par truie.

La semence est inséminée avec la sonde spiralée de MELROSE à travers le cervix par pression 10 à 15 mn après la décongélation. Au début et à la fin de l'insémination 30 à 40 ml de dilueur seul sont introduits dans l'utérus (volume total de l'IA 180 ml) selon la méthode proche de celle de KVASNITSKY (1959).

Une laparotomie pratiquée sur les truies non revenues en chaleur permet de compter par palper de l'utérus le nombre d'embryons présents.

## RESULTATS

Le taux de spermatozoïdes mobiles après décongélation est significativement différent pour ces deux dilueurs  $P < 0,01$  : dilueur INRA-ITP 17,6 % ; dilueur HULSENBERG 27,0 % (tableau 3). Cette différence ne se retrouve pas dans le taux de truies gestantes : dilueur INRA-ITP 10 truies sur 18 (55,5 %), dilueur HULSENBERG 9 truies sur 15 (60 %) (différence non significative). (tableau 3).

TABLEAU 3

TAUX DE SPERMATOZOÏDES VIVANTS APRES DECONGELATION ET TAUX DE GESTATION DE TRUIES NULLIPARES INSEMEEES AVEC DU SPERME CONGELE ET DECONGELE DANS DEUX DILUEURS DIFFERENTS

DILUEURS	TAUX DE SPZ MOBILES APRES DECONGELATION	NOMBRE DE TRUIES INSEMEEES	TAUX DE GESTATION	INTERVALLE IA - RETOUR (en jours)
INRA-ITP	17,6 ± 1,5 **	18	55,5 % (10/18)	18.19.20.21 21.21.31.38
HULSENBERG	27,0 ± 1,2 **	15	60 % (9/15)	18.19.20.21 27.28
TOTAL		33	57,5 %	

\*\* Différence hautement significative  $P < 0,01$ .

Après 30 jours ou plus de gestation, le taux d'œufs fécondés est significativement différent ( $P < 0,05$ ) chez les truies inséminées avec l'un ou l'autre dilueur (tableau 4). 10,6 embryons par truie pour 14 corps jaunes (taux d'œufs fécondés 75,7 %) sont retrouvés chez les truies gestantes inséminées avec le dilueur INRA - ITP et 5 embryons pour 12,8 corps jaunes (taux d'œufs fécondés 38,8 %) pour celles inséminées avec le dilueur HULSENBERG.

TABLEAU 4 : voir page suivante.

Cette différence dans la prolificité peut être rapprochée de la forte chute du taux de survie dans la période qui suit la décongélation des spermatozoïdes avec le dilueur HULSENBERG. Avec le dilueur INRA-ITP, la survie se maintient constante pendant les 3 premières heures d'incubation à 37°C, puis décroît rapidement. Avec le dilueur HULSENBERG, 50 % des spermatozoïdes périssent après 3 heures

TABLEAU 5 et GRAPHIQUE 1 : voir pages suivantes.

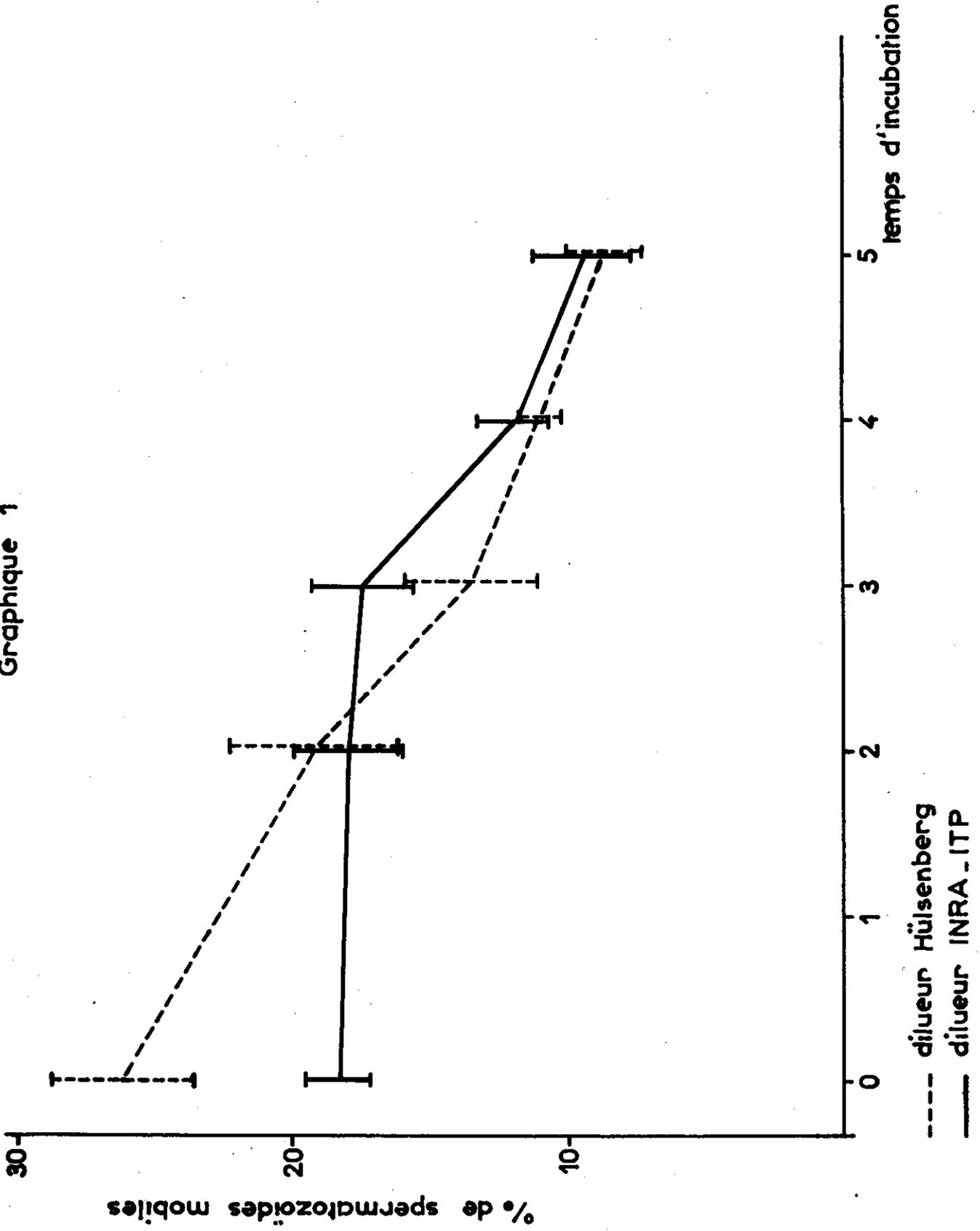
**TABEAU 4**  
**PROLIFICITE DE TRUIES NULLIPARES INSEMEES AVEC DU SPERME CONGELE**  
**ET DECONGELE DANS DEUX DILUEURS DIFFERENTS**

DILUEURS	INTERVALLE IA-LAPARAROTOMIE	NOMBRE DE CORPS JAUNES	NOMBRE D'EMBRYONS	TAUX MINIMUM D'OEUF FECUNDES
INRA - ITP (10 truies gestantes **)	42	17	16	94,1
	51	18	7	38,8
	49	15	14	93,3
	39	16	14	87,5
	40	13	8	61,5
	36	11	7	63,6
	31	10	10	100,0
	39	14	7	50,0
	35	13	11	84,6
	36	13	12	92,3
$\bar{m}$		14,0 ± 0,8	10,6 ± 1,0	75,7 % *
HULSENBERG (9 truies gestantes **)	38	14	6	42,8
	43	15	5	33,3
	69	10	1	10,0
	43	16	7	43,7
	41	15	5	33,3
	35	11	4	36,3
	35	12	7	58,3
	30	11	5	45,4
	30	12	5	41,6
$\bar{m}$		12,8 ± 0,7	5 ± 0,6	38,8 % *

**TABEAU 5**  
**SURVIE DES SPERMATOZOIDES APRES DIFFERENTES PERIODES D'INCUBATION A 37°C**  
**( $\bar{m}$  sur 5 éjaculats)**

DILUEURS	DUREE D'INCUBATION EN HEURES				
	0	2	3	4	5
INRA - ITP . . . . .	18,4 ± 1,2	18,0 ± 2,08	17,7 ± 1,9	12,0 ± 1,3	9,5 ± 1,8
HULSENBERG . . . . .	26,2 ± 2,6	19,2 ± 3,1	13,5 ± 2,4	11,0 ± 0,8	8,7 ± 1,4

Graphique 1



## DISCUSSION

La première partie de la méthode que nous utilisons est peu différente de celle mise au point par du MESNIL du BUISSON et DAUZIER en 1958 : dilution à la température ambiante du sperme non fractionné, dans un dilueur ne contenant ni lait, ni jaune d'œuf, conservation à 15°C. Dans ces conditions, les spermatozoïdes tombent en quelques heures en anabiose (ITO et al., 1949) ; (du MESNIL du BUISSON, 1956-1957).

Les centrifugations proposées par PURSEL et JOHNSON (1971a) et RICHTER et LIEDICKE (1972) permettent de concentrer l'éjaculat et d'éliminer le plasma séminal qui, d'après PURSEL et JOHNSON (1971b) aurait une influence défavorable sur le maintien de l'intégrité des acrosomes en cas de congélation. L'utilisation du lait et du jaune d'œuf comme agent protecteur pour la conservation à 5°C, a été proposée par beaucoup d'auteurs et pour presque toutes les espèces animales étudiées. L'emploi du glycérol est classique depuis les travaux de POLGE et al. (1949) sur le sperme de taureau.

Les taux de survie des spermatozoïdes au moment de la décongélation, indiqués par les différents auteurs sont en général assez faibles : 5-20 % (PURSEL et JOHNSON, 1971a), 30 % (CRABO et EINARSSON, 1971), 30-40 % (POLGE et al., 1970), 40 à 48 % (GRAHAM et al., 1971a). Les chiffres de 17 et 27 % que nous avons trouvés pour les deux dilueurs expérimentés sont bas également. Il est probable que les conditions de manipulations de la semence soient primordiales et que la qualité de la semence récoltée intervienne. Ainsi, RICHTER et LIEDICKE (1972) avec le dilueur Hülsenberg mis au point par eux, trouvent un taux de réviviscence de 50 à 60 % avec des verrats Landrace alors qu'avec le même dilueur et des verrats Large White, nous comptons seulement 27 % des spermatozoïdes survivants. Cette mauvaise survie entraîne une faible utilisation de chaque éjaculat : 6 ou 7 inséminations pour un éjaculat hebdomadaire au lieu de 25 à 30 avec du sperme frais. Rappelons qu'inversement, la mise en place par voie chirurgicale de sperme congelé dans les trompes (POLGE et al., 1970) permettait théoriquement d'inséminer 3.000 truies avec un seul éjaculat.

Les conditions de décongélation sont certainement très importantes pour le taux de survie des spermatozoïdes ; tous les auteurs s'accordent à prôner une grande vitesse de décongélation : chauffage des pellets sur une poêle Tefal à 37°C (PURSEL et JOHNSON, 1971a-1972), immersion dans un liquide à 65°C (GRAHAM et al., 1971a), ou à 50°C (RICHTER et LIEDICKE, 1972). La nature du dilueur de décongélation modifie le taux de survie. EINARSSON et al. (1972) trouve 20 % de survie en décongelant dans un milieu TES. Na K Glucose, 34 % dans du plasma séminal et 50 % dans du lait écrémé.

Les taux de mises-bas indiqués par les différents auteurs (tableau 2) se situent entre 0 et 90 % suivant les techniques utilisées, la prolificité moyenne entre 6 et 12 porcelets pour les nullipares et entre 6,3 et 14,5 porcelets pour les multipares. Il est difficile de comparer les méthodes, car en général, les essais portent sur 10 à 25 truies et la prolificité est calculée sur 4 à 10 portées. Il faut noter à part le résultat de PURSEL et JOHNSON (1972) : 61 % de truies gestantes sur 57 truies et celui de RICHTER et LIEDICKE (1972), 80 % de mises-bas, 7,6 porcelets en moyenne sur 51 truies multipares ayant mis bas. Notre expérience confirme une tendance à l'obtention de faible portée avec le dilueur HULSENBERG.

La perte du pouvoir fécondant (CRABO et al., 1972) ou la chute de la prolificité (EINARSSON 1972) observées après utilisation de certains dilueurs de décongélation comme le TES glucose ou le lait écrémé sont difficiles à comprendre. En effet, si CRABO et EINARSSON (1971) ont démontré que le plasma séminal de verrat constituait un milieu de décongélation favorable à une bonne fertilité-prolificité, il n'en reste pas moins qu'avec un dilueur de décongélation ne contenant aucune protéine, nous trouvons une moyenne de 10,6 embryons par truie.

A l'inverse du liquide séminal dans lequel certains ont voulu voir la clef de la décongélation, le glycérol a passé pour l'inhibiteur du pouvoir fécondant du sperme de verrat congelé. En effet, NEVILLE et al. (1970), GRAHAM et al. (1971b), ont montré que l'addition de 5 % de glycérol à du sperme frais abaisse de 25 à 30 % le taux de mises-bas et GRAHAM et al. (1971a) ne trouvent plus aucun pouvoir fécondant de sperme congelé glycérolé à 3 % (26 inséminations). Aussi PURSEL et JOHNSON (1971a) ont-ils imaginé de centrifuger le sperme mis en contact avec le glycérol immédiatement avant congélation pour éliminer ce glycérol : cette méthode est compliquée. Nous pensons - et c'est une conclusion que nous pouvons tirer de notre expérience, des résultats de POLGE et al. (1970) et de ceux de RICHTER et LIEDICKE (1972) - que le glycérol avec un taux compris entre 2 et 3 %, n'a pas d'effet propre inhibiteur du pouvoir fécondant pendant la phase précédant la congélation ou pendant la congélation. Il semble que le glycérol contrecarre seulement un mécanisme intervenant dans le tractus génital au niveau des spermatozoïdes ou de l'utérus et des trompes. La dilution intervenant juste avant l'insémination a l'avantage d'abaisser très fortement le taux de glycérol de la semence diluée introduite dans l'utérus.

## CONCLUSION

Notre expérience ne nous permet pas encore de désigner l'une ou l'autre des techniques récemment proposée comme immédiatement utilisable dans la pratique.

Les progrès réalisés ces deux dernières années sont cependant énormes et font entrevoir un espoir relativement proche.

Sans résoudre tous les problèmes de l'insémination porcine, on peut penser que la congélation du sperme constituera un élément facilitant. Elle rendra possible le choix de la semence par l'éleveur quelque soit le lieu de résidence du verrat et le stockage de la semence dans les grands élevages. Elle devrait éviter le gaspillage de la semence des meilleurs géniteurs.

Sur le plan génétique, le report de la semence sur plusieurs années permettra d'effectuer dans les meilleures conditions la mesure du progrès génétique de même qu'une sélection des verrats sur les qualités d'élevage de leurs filles.

## REMERCIEMENTS

Nous remercions Messieurs SEILLER et LIEDIECKE, et la direction des Etablissements SCHAUMAN qui nous ont très aimablement fourni le dilueur HULSENBERG que nous avons utilisé au cours de cette expérience.

Ce travail a été réalisé grâce à un financement du FORMA, 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.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BAIER W., 1962. *Zootech. Vet.* 17, 94-99.
- CRABO B., EINARSSON S., 1971. *Acta. Vet. Scand.* 12, 125-127.
- CRABO B., EINARSSON S., LAMM A.M., SOOSALU O., VIRING S., 1972. VIIth Intern. Congress on animal Reproduction and Artificial Insemination résumé, 331.
- DALRYMPLE J.R., McPHERSON J.W., 1969. *Can. J. Animal Sci.*, 49, 45-49.
- EINARSSON S., SOOSALU O., SWENSSON T., VIRING S., 1972. *Acta. Vet. Scand.*, 13, 446-448.
- GRAHAM E.F., RAJAMANNAN A.H., SCHMEHL M.K.L., MAKI-LAURILA M., BOWER R.E., 1971a, *A. I. Digest.* 19 (6), 6-8.
- GRAHAM E.F., RAJAMANNAN A.H.J., SCHMEHL M.K.L., MAKI-LAURILA M., BOWER R.E., 1971b. *A. I. Digest.* 19 (1), 12-14.
- HOFFMANN H.H., 1959. *Vet. Med. Diss, Tierärztl. Fak. Ludwig Maximilian-Univ., Munich.*
- ITO S., NIWA T., KUDO A., 1949. *Jap. J. Zootech. Sc.* 19, 113-118.
- KVASNITSKY A.V., 1959. *Annales de Zootechnie : Colloque sur la Reproduction et l'Insémination Artificielle du Porc*, 43-58.
- du MESNIL du BUISSON F., 1956. *Ann. Zootech.* III, 195-212.
- du MESNIL du BUISSON F., 1957. *Ann. Zootech.* IV, 391-399,
- du MESNIL du BUISSON F., DAUZIER L., 1958. *C.R. Acad. Sci.*, 247, 2472-2475.

- NAGASE H., NIWA T., 1964. V Cong. Int. Reprod. Anim. Insem. Artif., TRENTE, 4, 410-415,
- NEVILLE W.J., Mc PHERSON J.W., KING J., 1970. J. Anim. Sci., 31, 227.
- POLGE C., 1956. Vet. Rec. 68, 62-76.
- POLGE C., SALAMON S., WILMUT I., 1970. Vet. Rec. 87, 424-428.
- POLGE L., SMITH A.U., PARKES A.S., 1949. Nature (Lond.) 164, 666.
- PURSEL V.G., JOHNSON L.A., 1971a. J. Anim. Sci. 33, 265 (Abat).
- PURSEL V.G., JOHNSON L.A., 1971b. J. Anim. Sci., 33, (5) 1162 (Abst).
- PURSEL V.G., JOHNSON L.A., 1972. VIIth Intern. Cong. on Anim. Reprod. Artif. Insem. Résumé 333.
- PURSEL V.G., JOHNSON L.A., GERRITS P.J., 1969. J. Anim. Sci. 29, 196 (Abst).
- RICHTER L., LIEDICKE A., 1972. Communication personnelle.
- ROHLOFF D., 1967. Zuchthyg. 2 (2), 75-77.
- ROY A., 1955. Vet. Rec. 67, 330-331.