

28702

COMPARAISON DE TECHNOLOGIES DE CONSERVATION DES SPERMATOZOÏDES DE VERRAT EFFET SUR LES MECANISMES DE LA FECONDATION.

Laurence LWOFF (1), Jacqueline BEZARD (1), M. PAQUIGNON (2)

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

(2) Institut Technique du Porc, M.N.E 149, rue de Bercy - 75595 PARIS Cedex 12

I - INTRODUCTION

Les technologies actuelles de conservation de la semence à l'état liquide sont assez performantes puisqu'elles permettent d'obtenir une fertilité et une prolificité proches de celles obtenues en saillie naturelle (JOHNSON *et al.*, 1982 ; PAQUIGNON *et al.*, 1982). En revanche, la conservation par congélation est peu utilisée, car malgré les efforts entrepris pour améliorer la technologie de préparation, la fertilité et la prolificité sont encore très inférieures à celles obtenues avec des inséminations en sperme frais : taux de mise bas inférieur de 20 à 30 % et 1 à 3 porcelets en moins par portée (PAQUIGNON, 1984).

La réduction des capacités fécondantes des spermatozoïdes congelés peut provenir de différentes anomalies dans les étapes aboutissant à la formation de l'oeuf et à son développement: mauvaise remontée des spermatozoïdes congelés, réduction de leur survie dans le tractus femelle, diminution de leur capacité à pénétrer l'oeuf et à initier son développement ou retard dans le développement de l'oeuf.

Une étude sur la remontée des spermatozoïdes congelés dans le tractus femelle a déjà montré que le nombre de spermatozoïdes mobiles présents dans l'oviducte est identique que le sperme soit frais ou congelé (PURSEL *et al.*, 1978). En revanche la qualité de la fécondation ne semble pas avoir été étudiée.

L'objet de cette expérimentation est d'analyser cette fécondation en la comparant à celle obtenue avec du sperme frais.

II - MATERIEL ET METHODES

1° ANIMAUX :

24 femelles cycliques, nullipares et un verrat, de race Large-White, ont été utilisés dans cette expérience.

2° TRAITEMENT DU SPERME :

Après récolte manuelle et filtration sur de la gaze, la qualité de la semence est examinée sous microscope à contraste de phase, par évaluation du pourcentage de spermatozoïdes mobiles et de spermatozoïdes présentant un acrosome normal. Puis la semence est préparée pour son utilisation soit sous forme liquide après 12 à 24 heures de conservation à +15°C dans le dilueur GUELPH à raison de 3×10^9 spermatozoïdes totaux pour 100 ml, soit sous forme congelée selon la technique proposée par PAQUIGNON *et al.* (1974). Le nombre de spermatozoïdes totaux, pour le sperme frais ou congelé, est ajusté de telle sorte qu'il y ait, au moment de l'insémination, environ $2,5 \times 10^9$ spermatozoïdes mobiles pour chaque type de conservation de la semence.

3° TRAITEMENT DES TRUIES ET INSÉMINATION :

Deux fois par jour (matin et soir), les truies sont soumises à la détection des chaleurs à l'aide d'un verrat "bout en train". Au stade du proestrus (18ème - 19ème jour du cycle) caractérisé par le gonflement et la coloration de la vulve, ainsi que par la présence de sécrétions, les femelles reçoivent une injection de 500 U.I. d'hCG par voie intramusculaire à 21 heures (l'ovulation se situant environ 42 ± 2 heures après cette injection, HUNTER, 1967). Les truies, en oestrus, sont alors inséminées avec une dose de sperme frais ou congelé 24 ou 36 heures après l'injection d'hCG.

Les truies sont abattues 60 heures après l'injection d'hCG de façon à respecter un intervalle théorique moment d'ovulation - abattage, de 18 h.

4° EVALUATION DE LA QUALITE DE LA SEMENCE :

Avant chaque insémination, la qualité de la semence, que ce soit en sperme frais ou congelé, est évaluée au microscope à contraste de phase, entre lame et lamelle, après 1/4 d'heure et 3 heures d'incubation à 37°C, par le pourcentage de spermatozoïdes mobiles et de spermatozoïdes à bord apical normal.

L'évaluation du pourcentage de spermatozoïdes mobiles est effectuée à l'oeil par le même observateur. Le pourcentage de spermatozoïdes ayant un bord apical normal est déterminé sur une lame après comptage de 100 spermatozoïdes préalablement fixés dans une solution de glutaraldéhyde à une concentration finale de 1 %.

5° COLLECTE DES OVOCYTES :

Dès l'abattage, le tractus femelle est prélevé. Les corps jaunes présents sur chaque ovaire sont comptés, et leur aspect est noté. Chacun des oviductes est disséqué, puis perfusé avec 20 ml de sérum physiologique de façon à récupérer, dans des boîtes de Pétri, les ovocytes.

Le pourcentage de récupération est évalué en rapportant le nombre d'ovocytes collectés, au nombre de corps jaunes observés sur les ovaires.

6° HISTOLOGIE :

Les ovocytes sont immédiatement fixés dans le Bouin Holland pendant une durée minimale de 24 h à température ambiante (20°C), et maximale de 3 jours, la température de conservation étant alors de 15°C dès le 2ème jour.

Après plusieurs rinçages à l'eau distillée, les ovocytes de chaque truie sont inclus dans la gélose (1,3 %), deshydratés, puis inclus dans la paraffine. Chaque bloc est coupé au microtome.

Les coupes (10 μ) sont colorées à l'hémalum (hématoxyline d'Ehrlich 2%-10') pour mettre en évidence le matériel chromosomique, et à l'éosine (0,5 % solution aqueuse - 5'') pour obtenir une coloration de fond.

Sur chaque coupe, et pour chaque ovocyte, le nombre de spermatozoïdes et leur position par rapport à la pellucide sont notés. Le stade de développement des ovocytes est également déterminé. Ceux présentant une plaque métaphasique et un globule polaire ont été considérés comme non fécondés.

7° ANALYSE DES RESULTATS :

L'analyse des résultats, donnés sous forme de pourcentage, s'est faite comparativement en utilisant un test non paramétrique : test de KRUSKALL et WALLIS.

III - RESULTATS

1° QUALITE DU SPERME AVANT L'INSEMINATION :

Dès le début ou après 3 heures d'incubation, le pourcentage de spermatozoïdes mobiles et le pourcentage de spermatozoïdes à acrosomes normaux sont significativement plus élevés quand la semence est conservée à l'état frais plutôt que congelé ($P < 0,05$) (Tableau 1).

Après 3 heures d'incubation, la chute de la qualité de la semence est plus importante après congélation qu'après conservation à l'état frais (Tableau 1).

TABLEAU 1
ÉVOLUTION DE LA QUALITÉ DES SPERMATOZOÏDES APRÈS 0 H ET 3 H D'INCUBATION

Insémination	Spermatozoïdes mobiles (%)		Acrosomes normaux (%)	
	0H	3H (1)	0 H	3 H
Frais	79,8 \pm 1,7	57,2 \pm 7,4	83,8 \pm 3,8	71,6 \pm 4,5
Congelé	21,2 \pm 2,3	11,9 \pm 1,7	31,4 \pm 3,4	19,2 \pm 2,9

n = 5 ($\bar{m} \pm sm$)

(1) 3 heures d'incubation à 37 °C dans le milieu d'origine

2° QUALITE DES ŒUFS :

a) Taux de récupération :

Le pourcentage d'œufs recueillis par rapport au nombre total d'ovulations et le pourcentage d'œufs effectivement analysés après les différentes étapes de préparation par rapport au nombre d'œufs recueillis sont respectivement de 98,4 % et 88,9 %.

b) Taux de gestation et de fécondation :

Toute truie ayant au moins un ovocyte fécondé et tout ovocyte ayant un fuseau de télophase ont été respectivement considérés comme gravide ou comme fécondé.

Bien que non significatif, le pourcentage de truies gravides obtenu après insémination artificielle en sperme congelé (9/12) est inférieur à celui obtenu après insémination en sperme frais (12/12). En revanche le pourcentage d'œufs fécondés par truies gravides obtenu après conservation de la semence à l'état congelé (37,3%) est significativement inférieur à celui obtenu après conservation à l'état frais (81,0 %) ($P < 0,05$). (Tableau 2).

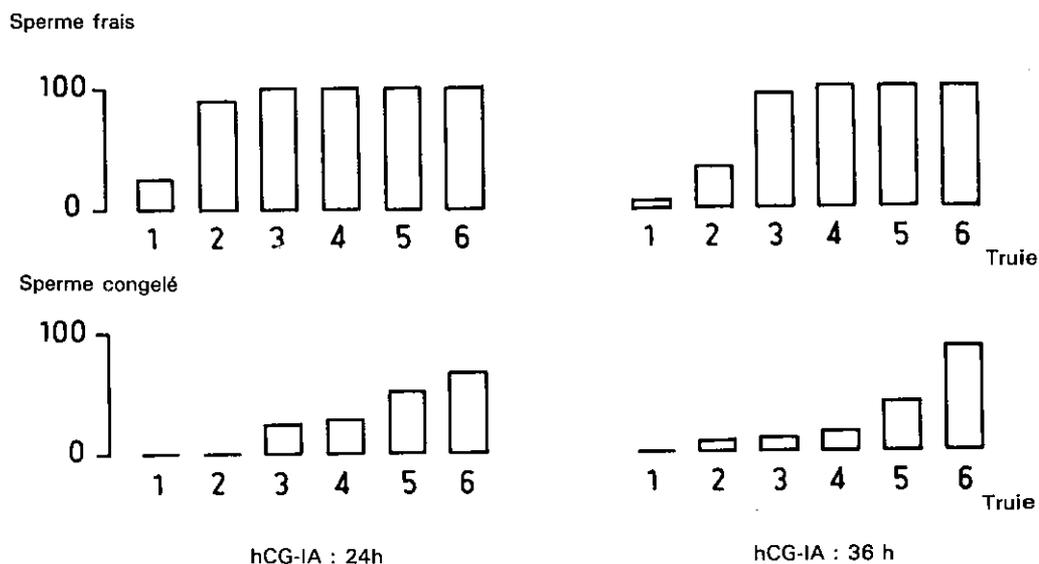
TABLEAU 2
BILAN DES DIFFERENTES ETAPES DE LA COLLECTE ET DE L'ANALYSE DES ŒUFS

Insémination	Intervalle hCG I.A. (h)	Nb de femelles		Nb œufs/truie fécondée				Spz/œufs
		inséminées	gravides	analysés	fécondés normalement	fécondés anormalement	non fécondés	
Frais	24	6		83	70 (81,0)	2	11	27,9 (36,9)
	36	6	6	96	75	0	21	44,7
Congelé	24	6	4	56	25 (37,3)	1	30	0,8 (0,9)
	36	6	5	70	22	0	48	0,9

() Pour chaque colonne concernée, pourcentage d'œufs fécondés ou nombre de spermatozoïdes

A l'intérieur de chaque mode de conservation, la répartition du pourcentage d'œufs fécondés par truie varie d'une façon importante. Ainsi avec le sperme frais, le taux d'œufs fécondés semble obéir à la loi du tout ou rien avec une grande homogénéité pour chaque catégorie. Neuf truies sur 12 ont un taux d'œufs fécondés supérieur à 90 % alors que pour les trois autres, il est compris entre 7 et 36 %. En revanche, avec la semence congelée, le taux d'œufs fécondés, avec des valeurs plus dispersées que précédemment variant de 9.1% à 88.2% mais n'atteignant jamais 100 %, est plus hétérogène (Fig. 1).

FIGURE 1
ŒUFS FÉCONDÉS (%)



Il n'y a pas d'effet significatif du moment de l'insémination sur le pourcentage de truies gravides et d'oeufs fécondés (Tableau 2).

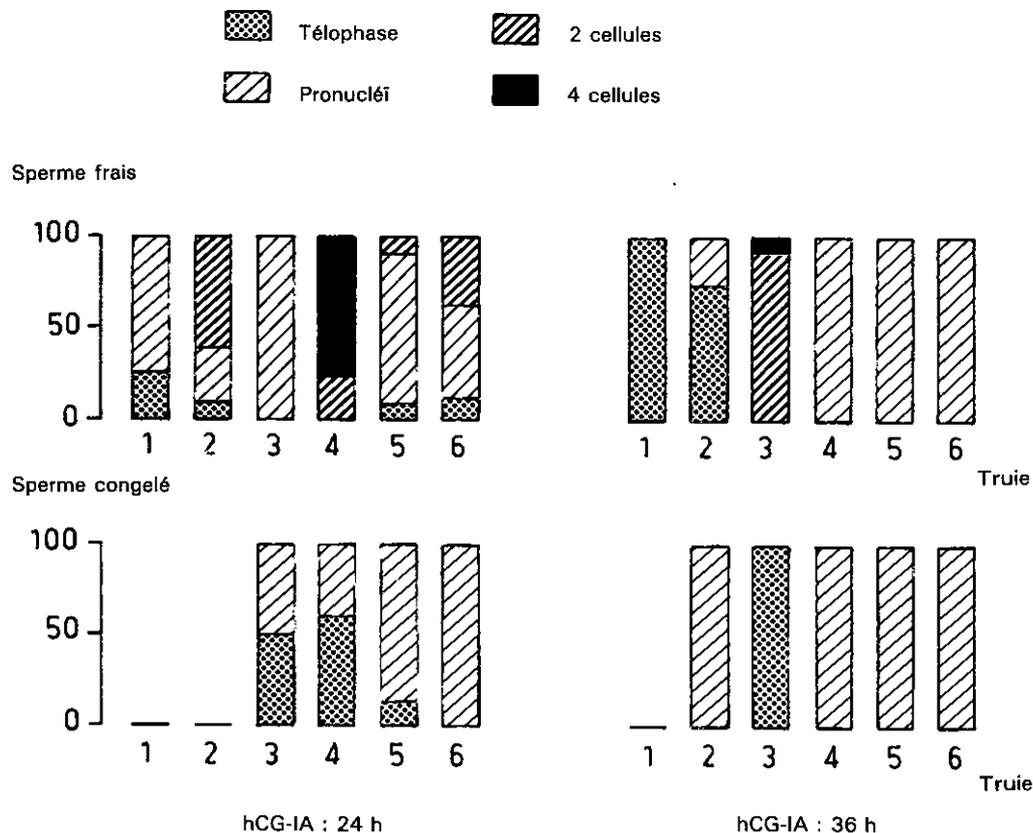
c) Stade de développement des oeufs fécondés :

Quels que soient la méthode de conservation et le moment de l'insémination, tous les oeufs non fécondés apparaissent au stade métaphase II. Parmi les oeufs fécondés, quatre stades différents de développement ont pu être dénombrés : télophase, pronuclei, 2 cellules et 4 cellules avec une prédominance du stade pronuclei. Chacun d'entre eux représente respectivement 8,2 % - 67,4 % - 19,2 % et 5,2 % des oeufs fécondés.

D'une truie à l'autre, le stade de développement est plus ou moins homogène et varie selon le moment de l'insémination et la nature du sperme inséminé.

Le stade de développement des oeufs fécondés semble plus homogène après un intervalle hCG-IA de 36 h qu'après un intervalle hCG-IA de 24 h. Ainsi après un intervalle hCG-IA de 36 h sur les 11 truies gravides, 9 ont des oeufs avec un seul stade de développement (télophase ou pronuclei), les deux autres ont des oeufs à deux stades différents (télophase et pronuclei ou 2 et 4 cellules). En revanche, après un intervalle hCG-IA de 24 h sur les 10 truies gravides, seulement deux ont des oeufs à un seul stade de développement (pronuclei), 5 ont des oeufs à deux stades différents (télophase et pronuclei ou 2 et 4 cellules) et 3 ont des oeufs à trois stades différents (télophase, pronuclei et 2 cellules) (Fig. 2).

FIGURE 2
STADE DE DÉVELOPPEMENT DES ŒUFS FÉCONDÉS



Après insémination en sperme frais, le stade de développement des oeufs apparaît plus avancé qu'après insémination en sperme congelé. Ainsi parmi les 12 truies inséminées avec du sperme

frais, 5 d'entre elles ont des oeufs segmentés alors que cette segmentation n'apparaît chez aucune des truies inséminées avec du sperme congelé (Fig. 2).

Quels que soient la méthode de conservation et le moment de l'insémination, le nombre d'anomalies de la fécondation est très faible puisque seulement trois oeufs ont été fécondés anormalement.

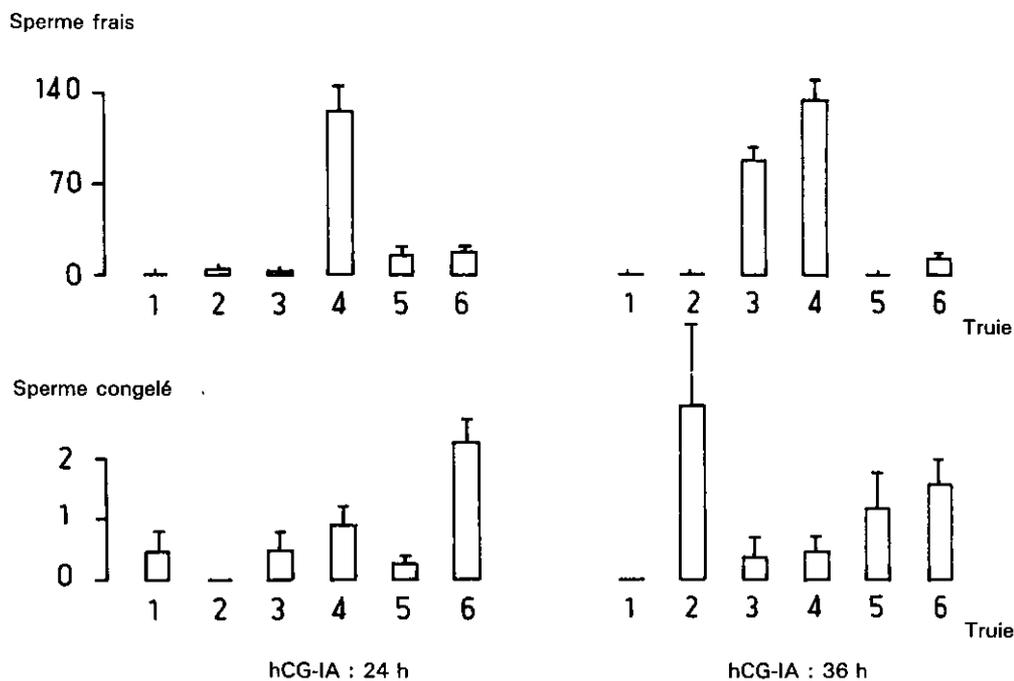
3° ASPECT DES SPERMATOZOÏDES SUR L'ŒUF :

Après insémination en sperme frais et congelé, les nombres moyens de spermatozoïdes retrouvés autour d'un ovocyte sont respectivement de 36.9 et 0.9 ($P < 0.05$). Ils ne varient pas significativement selon les différents moments d'insémination (Tableau 2).

Chez une même truie, le nombre de spermatozoïdes, entourant chacun des ovocytes, est relativement constant, et ce, quelle que soit la répartition des stades de développement atteints par les oeufs. Cette remarque est également valable pour les oeufs non fécondés.

Le nombre de spermatozoïdes par oeuf est relativement homogène pour chaque truie inséminée avec du sperme congelé, par contre, il est très hétérogène pour les truies inséminées avec du sperme frais (Figure 3).

FIGURE 3
NOMBRE DE SPERMATOZOÏDES PAR ŒUF



Aucune différence, entre truies inséminées avec du sperme frais ou congelé, n'a été observée dans la position des spermatozoïdes autour de l'ovocyte. Tous se trouvent sur la pellucide, orientés parallèlement ou faisant un léger angle avec la surface de l'ovocyte.

Quelle que soit la méthode de conservation, aucun spermatozoïde n'a été retrouvé dans l'espace périvitellin. Peu de flagelles et de pièces intermédiaires ont été observés, que les oeufs soient fécondés ou non.

IV - DISCUSSION

Les résultats de cette étude montrent que le pourcentage d'oeufs fécondés par truie et le nombre de spermatozoïdes par oeuf est beaucoup plus faible chez les truies inséminées avec du sperme congelé que chez les truies inséminées avec du sperme frais. Par contre, l'étude histologique de l'ensemble des oeufs n'indique aucune différence entre sperme frais et congelé sur la qualité de la fécondation. Tous les ovocytes pénétrés par un spermatozoïde congelé émettent le 2ème globule polaire et se développent. Aucune anomalie spécifique liée à l'insémination en sperme congelé n'a pu être mise en évidence. Les seuls cas particuliers observés ne diffèrent pas significativement d'un lot à l'autre.

Tout semble se passer selon une loi de type "tout ou rien" ou bien le spermatozoïde congelé arrive à pénétrer l'ovocyte et celui-ci subit une évolution apparemment normale, ou bien il ne peut traverser les membranes et l'ovocyte n'est pas fécondé.

Les conditions de rencontre des gamètes femelles et des gamètes mâles ne semblent donc pas les mêmes quand la semence utilisée est conservée à l'état frais ou congelé.

Le point essentiel, dans la baisse des capacités de fécondation des spermatozoïdes congelés, serait donc essentiellement prézygotique. Un nombre insuffisant et une survie limitée des spermatozoïdes congelés atteignant le site de fécondation peuvent en être la cause. Cependant, dans notre expérience où les inséminations sont réalisées 6 ou 18 heures avant le moment présumé de l'ovulation, les doses de semence avaient été ajustées de façon à contenir le même nombre de spermatozoïdes mobiles avant l'insémination, quel que soit le mode de conservation du sperme. Or, PURSEL *et al.* (1978) ont montré que, 4 et 14 h après le dépôt du sperme dans l'utérus, le nombre de spermatozoïdes mobiles présents dans l'oviducte était identique que le sperme soit frais ou congelé. De plus, quel que soit le moment de l'insémination, nous n'avons pas observé de différence dans le taux d'oeufs fécondés et dans le nombre de spermatozoïdes par oeuf.

L'ensemble de ces éléments nous autorise à penser que l'effectif des gamètes mâles mobiles présents sur le site de fécondation n'est pas l'élément essentiel permettant d'expliquer les différences de fécondation entre sperme frais et congelé. La diminution de spermatozoïdes à acrosomes normaux et la profonde altération de la membrane des spermatozoïdes après congélation (COURTENS et PAQUIGNON, 1985) entraînant la disparition des sites de liaison avec la pellucide (PETERSON *et al.*, 1981) nous laissent penser que la qualité de la semence est l'élément déterminant dans la chute du taux de fécondation après I.A. en sperme congelé. L'altération de la capacité de fécondation serait totale, interdisant même la fixation sur la pellucide, ou bien inexistante, ce qui expliquerait à la fois le faible nombre de spermatozoïdes présents autour des ovocytes et le type de réponse "fécondé-non fécondé" obtenu.

Le deuxième point central de nos observations concerne le stade de développement des oeufs fécondés. L'analyse des résultats met ainsi en évidence une prédominance du stade pronuclei dans tous les lots et la présence d'oeufs segmentés uniquement dans le cas d'insémination en sperme frais.

L'existence, au moment de l'abattage 18 heures après l'ovulation présumée, d'oeufs segmentés au stade 4 cellules alors que ceux-ci n'apparaissent théoriquement que 22 heures après l'activation (HUNTER, 1973) et la prédominance du stade pronuclei alors que le stade deux cellules aurait dû prédominer (HUNTER, 1973), prouvent que chez ces femelles tout au moins, l'ovulation a eu lieu plus tôt ou plus tard que prévue et que la réponse à l'hCG a été soumise à des variations individuelles importantes.

Dans ces conditions, il est difficile d'être certain du moment précis de l'ovulation et d'affirmer que l'insémination en sperme congelé entraîne un certain retard de développement des oeufs fécondés.

V - CONCLUSION

Cette étude a permis de mettre en évidence des différences importantes dans les conditions de fécondation des ovocytes, chez les truies inséminées avec du sperme frais ou congelé. La diminution du pourcentage d'ovocytes fécondés après insémination en sperme congelé peut expliquer, en partie, la chute de la taille des portées. Une réponse de type "tout ou rien", "fécondé ou non fécondé" est obtenue sans intermédiaire dans le processus d'activation.

Etant donné les résultats d'études précédemment menées sur la mobilité des spermatozoïdes congelés et leur remontée dans le tractus femelle, la baisse de fécondation pose le problème de la congélation, plus en terme de qualité des spermatozoïdes qu'en terme d'effectifs présents sur le site de fécondation.

L'étude des oeufs met en évidence une différence dans les stades de développement des ovocytes fécondés par les deux types de spermatozoïdes. Cependant, cette observation ne peut servir de base solide à des hypothèses concernant le devenir des embryons, étant donnée l'importance du facteur individuel dans la réussite de l'insémination en sperme congelé.

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé grâce à l'aide d'un contrat cryobiologie (Code INRA 1247 A). Nous tenons à remercier Monsieur E. PALMER impliqué avec nous dans ce contrat.

BIBLIOGRAPHIE

- COURTENS J.L., PAQUIGNON M., 1985. 1st Int. Conf. Deep. Freezing Boar Semen, Uppsala 61-87.
- HUNTER R.H.F., 1967. Vet. Rec. **81**, 21-23.
- HUNTER R.H.G., 1973. Anat. Rec. **178**, 169-186.
- JOHNSON L.A., AALBERS J.G., WILLEMS C.M.T., RADEMAKER J.H.M., REXROAD C.E., 1982. J. Anim. Sci. **54**, 132-136.
- PAQUIGNON M., MERGOUNIS D., COUROT M., Du MESNIL-du-BUISSON F., 1974. Journées Rech. Porcine en France, **6**, 71-74.
- PAQUIGNON M., BARITEAU F., BUSSIERE J., DACHEUX J.L., COUROT M., 1982. Journées Rech. Porcine en France. **14**, 85-89.
- PAQUIGNON M., 1984. Curr. Top. Vet. Med. Anim. Sci. **30**, 202-218.
- PETERSON R.N., RUSSEL L.D., BUNDMAN D., CONWAY M., FREUND M., 1981. Develop. Biol. **84**, 144-156.
- PURSEL V.G., SCHULMAN L.L., JOHNSON L.A., 1978. Biol. Reprod., **19**, 69-76.