

Conservation de la semence congelée de verrat Résultats in vitro et après insémination

J.-F. BUSSIÈRE, G. BERTAUD, P. GUILLOUET

*Institut National de la Recherche Agronomique.
Unité Expérimentale d'Insémination Caprine et Porcine - 86480 Rouillé*

Conservation de la semence congelée de verrat. Résultats in vitro et après insémination

Pour la constitution de la cryobanque porcine européenne des races locales, une méthode de congélation de la semence de verrat a été élaborée, à partir de travaux antérieurs. Cette méthode utilise des paillettes de 0,5 ml et deux dilueurs à base de lactose, jaune d'œuf, orvus es paste et glycérol. Des résultats in vitro sur 110 éjaculats montrent que le pourcentage de spermatozoïdes mobiles après congélation / décongélation, observé après 10 et 120 minutes d'incubation, est respectivement de 43% et 23%, le pourcentage de spermatozoïdes vivants normaux étant de 33% et 22%. Un délai de 24 heures entre la collecte et la congélation ne semble pas affecter la qualité de la semence après décongélation. Chaque dose d'insémination est préparée à partir de 5 paillettes, contenant 0,8 milliards de spermatozoïdes, diluées dans du BTS, seules les paillettes contenant au moins 30% de spermatozoïdes vivants normaux étant retenues. Les 193 truies utilisées pour l'évaluation in vivo sont inséminées deux ou trois fois, avec des doses provenant de 107 verrats au total. Les femelles sont réparties dans 7 élevages. Le taux de gestation à 21 jours est de 74% et le taux de mise bas de 69%. La taille de portée est en moyenne de 9,97+ 0,54 nés totaux.

Conservation of boar semen by freezing. Evaluation in vivo and after insemination

A method has been developed to freeze semen, in order to create an European porcine cryobank, which will enable local breeds to be preserved. The method is based on the use of two cryo-diluters prepared with lactose egg yolk, O.E.P. and glycerol and the use of 0.5 ml straws. The results from 110 ejaculates showed that after freezing/thawing and either 10 or 120 minutes of incubation the % of motile sperm were 43% and 23%, respectively and the % of normal live sperm were 33% and 22%, respectively. An interval of 24 hours between collection and freezing did not appear to influence in vitro results. Sows were inseminated with 5 straws containing 0.8 billion sperm diluted in B.T.S. extender. Straws were only used when they contained at least 30% live and normal spermatozoa. 193 sows inseminated 2 to 3 times with sperm from 107 boars were used to evaluate in vivo the method. The sows came from 7 farms. Seventy-four percent of females (n = 193) were pregnant at 21 days (measure by ultrasonography) and 68% farrowed with a mean litter size of 9.97 (+0.54).

INTRODUCTION

L'insémination artificielle porcine est basée essentiellement sur l'utilisation de la semence fraîche diluée jusqu'à trois à cinq jours après collecte, avec des résultats de fertilité et de prolificité comparables à la saillie naturelle. En France, plus de deux millions de double doses produites en CIA ont été utilisées en 1997. Cependant la sauvegarde des races et le transfert de génétique sans limite de durée de transport nécessite de conserver la semence sous forme congelée. Trois méthodes principales ont été décrites et peuvent se regrouper en trois catégories en fonction du conteneur utilisé : les pellets, les pailles et les paillettes. La méthode des paillettes de 0,5 ml donnait les meilleurs résultats *in vitro* (PAQUIGNON et al., 1986).

L'objectif de ce travail est de décrire une méthode de congélation adaptée des travaux de WESTENDORF et al (1975), PAQUIGNON (1989) et THILMANT (1997) et d'évaluer *in vitro* et *in vivo* son efficacité.

1. MATÉRIEL ET MÉTHODE

1.1. Origine et estimation de qualité de la semence

La semence congelée est préparée à partir de la fraction riche de l'éjaculat de verrats de centre d'insémination ou inclus dans des programmes de sauvegarde de races locales. Le pourcentage de spermatozoïdes mobiles et la note de motilité (échelle de BISHOP et al., 1954) sont estimés par observation, entre lame et lamelle, d'une goutte de 10 µl de semence pure placée sur une platine chauffante à 37°C, au grossissement de 100 en contraste de phase.

1.2. Technique de congélation et de décongélation

1.2.1. Principe général

L'abaissement de la température diminue la vitesse des réactions chimiques qui sont totalement inhibées à -273°C, alors qu'en dessous de -150°C aucune réaction intervenant dans des processus biologiques n'est possible. L'azote liquide dont la température à la pression atmosphérique est de -196°C permet de conserver des cellules vivantes dont le métabolisme est totalement bloqué. Le problème consiste à amener les cellules vivantes à cette température puis de les ramener à la température de fonctionnement en restaurant leurs fonctions.

Les principales difficultés surviennent lors de la cristallisation de l'eau du milieu de conservation et de l'eau intracellulaire, la formation de cristaux pouvant causer des dommages irréversibles à la structure cellulaire. Des problèmes liés aux variations de pression osmotique et à la modification de la structure des lipides membranaires sont aussi

à l'origine des dommages causés lors du cycle congélation / décongélation.

1.2.2. Description de la technique

Après prélèvement de la fraction riche, la semence est diluée de moitié dans du BTS (Beltsville Thawing Solution) puis refroidie jusqu'à 15°C. Elle est ensuite centrifugée pendant 25 minutes à 800g à 15°C et le surnageant est éliminé. On additionne alors le dilueur de refroidissement (lactose 11%, jaune d'œuf 20% et O.E.P.1,6%, eau pure q.s.p. pour 100ml) au culot de centrifugation pour obtenir une concentration de 1,7 milliards de spermatozoïdes par ml, puis la semence est amenée à la température de 5 °C en deux heures. La glycérolisation est effectuée avec le même dilueur additionné de 6% de glycérol afin d'obtenir une concentration de 3% de glycérol dans la solution finale. L'addition du dilueur glycérolé se fait en trois fois. Le temps d'exposition est de 90 minutes avant la mise en œuvre de la congélation.

Le conditionnement se fait en paillettes PVC de 0,5 ml (IMV), contenant 0,8 milliards de spermatozoïdes. Les paillettes sont ensuite exposées aux vapeurs d'azote à 4 cm au-dessus du niveau du liquide pendant 5 minutes puis plongées dans l'azote liquide.

La décongélation se fait en plongeant les paillettes 12 secondes dans l'eau d'un bain marie à 55°C.

1.3. Évaluation *in vitro* et *in vivo*

1.3.1. Évaluation *in vitro*

Après décongélation et dilution dans du BTS à la concentration de 40 millions de spermatozoïdes par ml, la semence est placée au bain marie à 37°C. Deux séries d'observations sont réalisées après 10 minutes et 120 minutes d'incubation, les mêmes estimations et comptages que pour la semence fraîche étant effectuées. En outre, une coloration éosine-nigrosine est faite pour évaluer le pourcentage de spermatozoïdes vivants-normaux par comptage de 200 cellules au grossissement de 1000, en immersion et en contraste de phase.

1.3.2. Évaluation *in vivo*

Les paillettes ont été préparées à partir d'éjaculats de 107 verrats appartenant à 11 génotypes différents. Une dose d'insémination est reconstituée à partir de 5 paillettes décongelées et diluées dans 90 ml de BTS. Les truies sont inséminées deux ou trois fois. Le contrôle de gestation est réalisé par échographie à partir de 21 jours post-insémination. Sur un effectif total inséminé de 193 truies, 94 ont été abattues entre 30 et 45 jours après l'insémination, il s'agissait de truies destinées à la réforme ou impliquées dans des protocoles nécessitant un abattage en cours de gestation. Sur ces dernières la présence ou l'absence de fœtus a été vérifiée. Pour les 99 autres réparties dans cinq élevages, la date de retour ou de la mise bas et le nombre total de porcelets nés ont été enregistrés.

2. RÉSULTATS

2.1. Résultats in vitro

Les observations portent sur 110 éjaculats. Avant congélation le pourcentage de spermatozoïdes mobiles de ces éjaculats se situe entre 70 et 90 % (figure 1). Cette répartition est conforme à celle rencontrée pour des éjaculats provenant d'une population de centre d'insémination (GUILLOUET et al., 1999).

Après décongélation on observe une baisse importante du taux de spermatozoïdes mobiles par rapport à la semence fraîche (figure 1). En effet, après 10 minutes d'incubation au bain-marie à 37°C, le pourcentage de spermatozoïdes mobiles moyen est de 43%. De plus on constate une variabilité plus élevée qu'avec la semence fraîche, le taux de mobilité variant de 15 à 85 %, avec un écart type de 13,4 %. Après 120 minutes d'incubation à 37°C, le pourcentage de spermatozoïdes mobiles n'est plus en moyenne que de 23,5% avec un écart type de 13,25 %.

Le taux de spermatozoïdes vivants normaux après décongélation (figure 2) montre le même type d'évolution : ainsi, après 10 et 120 minutes d'incubation, il est respectivement de 33 % et 22 %. La répartition est étalée avec des écarts types de 14,92% et 12,62%, respectivement pour les deux temps d'incubation. Cette diminution au cours du temps des critères de qualité de la semence après congélation / décongélation ne s'observent pas dans les mêmes conditions en semence fraîche (résultats non publiés).

L'intervalle de temps entre la collecte et la congélation, dans une limite de 24 heures, ne semble pas affecter la qualité des spermatozoïdes après décongélation (figure 3), la semence étant conservée à 15°C diluée pour moitié dans du BTS.

2.2. Résultats in vivo

Les doses d'insémination ont été préparées à partir des éjaculats de 107 verrats. A la décongélation seuls les éjaculats présentant un taux de spermatozoïdes vivants et normaux au moins égal à 30 % ont été retenus. Ce choix a conduit à écarter 29% des verrats et 42% des éjaculats. Les paillettes retenues ont servi à inséminer 193 truies. Ces femelles appartenaient à 26 bandes réparties dans 7 élevages.

Le taux de gestation contrôlé par échographie à 21 jours est de 74%. Le taux de mise bas est globalement de 69%, mais il varie de 40 à 77 % selon l'élevage. Le nombre total de porcelets nés est en moyenne de 10, mais il varie de 4 à 15. Les triples inséminations (n=35) et les doubles inséminations (n=64) ont donné respectivement 62% et 71% de gestations.

3. DISCUSSION

Cette méthode donne des résultats de mise bas identiques à ceux publiés par MILEHAM et al 1997. Ils sont cependant inférieurs à ceux obtenus par THILMANT (1997 et 1999),

Figure 1 - Répartition des éjaculats en fonction du pourcentage de spermatozoïdes mobiles

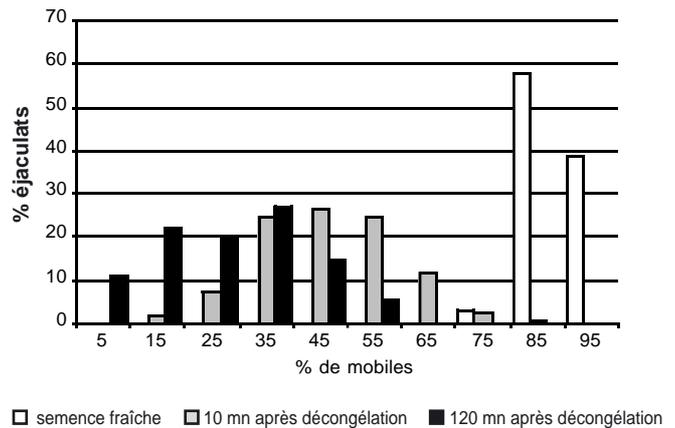


Figure 2 - Répartition des doses en fonction du pourcentage de spermatozoïdes vivants et normaux après décongélation (n=110)

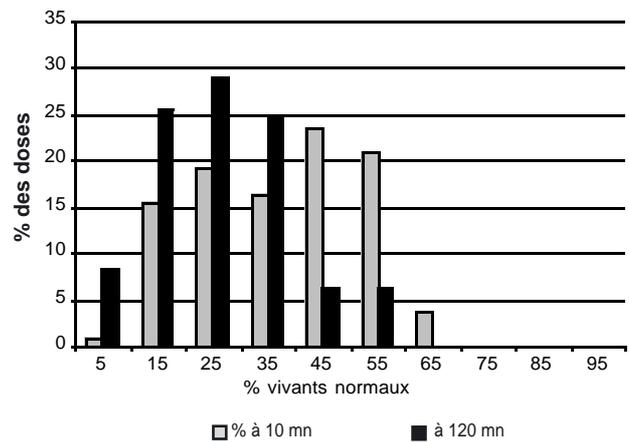
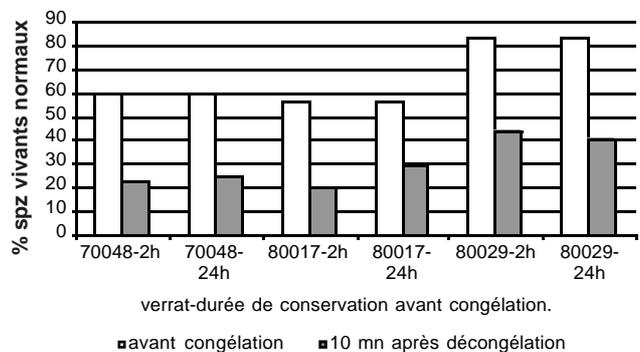


Figure 3 - Influence de la durée de conservation avant congélation (2h ou 24h) sur le pourcentage de spermatozoïdes vivants et normaux après décongélation (résultats pour 3 verrats)



mais cet auteur a utilisé des critères de sélection de la semence décongelée plus sévères (50% d'acrosomes normaux et 65% de spermatozoïdes vivants dans la semence diluée après décongélation). Aucune des études précédentes

n'indique le taux de sélection des éjaculats ni le nombre de verrats écartés. Le choix du seuil minimum de spermatozoïdes normaux est déterminant pour l'efficacité globale de la méthode. En effet, avec un seuil de 20% de vivants normaux, 77% des éjaculats et 89 % des verrats seraient conservés. Encore faudrait-il vérifier les conséquences en termes de fertilité et de prolificité de l'abaissement du seuil à 20%.

Néanmoins avec ce seuil de 30% appliqué dans notre étude, il a été possible d'obtenir des mises bas dans tous les génotypes utilisés. La triple insémination n'a pas amélioré le taux de mise bas. Appliquée dans ces conditions la méthode est généralisable, ce qui est particulièrement important dans le cadre des programmes de conservation de races. Sur le

plan de la réalisation pratique, le lieu de collecte et celui de la congélation peuvent être distant. En effet des paillettes avec une viabilité acceptable ont pu être préparées avec des éjaculats collectés la veille. Ce résultat est en accord avec ceux de PAQUIGNON et COUROT (1975) et ARRUDA et al. (1997). Il reste à vérifier s'il est possible de conserver, au moins 24 heures, la dose reconstituée à partir de semence décongelée

Même si ces améliorations étaient acquises, la semence congelée restera dans un domaine d'utilisation complémentaire de la semence fraîche, pour la conservation de gènes où elle se développe et le transfert de génétique ou elle commence à être utilisée.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ARRUDA E.B., WABERSKY D., WEITZE K.F., 1997, *Reprod. in Dom. Anim.*, 32-1,87.
- BISHOP M.N.H., CAMPBELL R.C., HANCKOCK J.L., 1954, *J. Agriculture Science*, 44, 227.
- GUILLOUET P., TRIBOUT T., BUSSIERE J.F. et al, 1999, *Journées Rech. Porcine en France*, 31, 45-52.
- MILEHAM A.J., HAVEN D., ROHL J., VAN DER STEEN H.A.M., 1997, *Fifth International Conference on Pig Reproduction*, 128.
- PAQUIGNON M., COUROT M., 1975, *Ann. Zootech.*, 24 (4), 645-650.
- PAQUIGNON M., QUELLIER P., DACHEUX J.L., 1986, *Ann. Zootech.*, 35, (2), 173-184.
- PAQUIGNON M., 1989. Thèse de doctorat de l'Université de Sciences du Languedoc.
- THILMANT P., 1997, *Ann. Méd. Vét.*, 141, 457-462.
- THILMANT P., 1999, *Journées Rech. Porcine en France*, 31, 59-64.
- WESTENDORF P., RICHTER L. TREU H., 1975, *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift*, 82, 261-300.