

## APTITUDE DES TAUREAUX UTILISABLES EN INSÉMINATION ARTIFICIELLE A LA PRODUCTION DE SEMENCE CAPABLE DE SUPPORTER LA CONGÉLATION

M. GOFFAUX

*Laboratoire de Physiologie de la Reproduction,  
Centre national de Recherches zootechniques, Jouy-en-Josas (Seine-et-Oise) ;  
Laboratoire de contrôle biologique et sanitaire des Reproducteurs, École nationale vétérinaire, Alfort*

---

### SOMMAIRE

192 éjaculats de 48 taureaux ont été congelés dans un congélateur automatique à vapeurs d'azote après dilution dans un dilueur lait écrémé-glycérol et le pourcentage de spermatozoïdes mobiles apprécié au microscope avant et après congélation.

Les corrélations trouvées entre pourcentages de spermatozoïdes mobiles avant et après congélation (0,48 inter-éjaculats et 0,68 inter-taureaux.  $P < 0,01$ ) permettent d'éliminer avant congélation les taureaux et les éjaculats particulièrement mauvais. Une méthode pratique de sélection en vue de la congélation est indiquée.

---

Dans le domaine de l'Insémination Artificielle, de nombreuses recherches ont mis en évidence, entre taureaux, des différences qui s'expriment de façon immédiate par le taux de spermatozoïdes mobiles à l'examen microscopique de leurs éjaculats.

Alors que ces différences se manifestent régulièrement au cours des expérimentations portant sur la congélation, lorsque celles-ci comportent un nombre suffisant de taureaux non spécialement sélectionnés, chacun d'eux étant récolté plusieurs fois (BUCH, SMITH et TYLER, 1956 ; O'DELL et HURST, 1956 ; ERIKSON et GRAHAM, 1954 ; KENNELLY 1960) elles apparaissent beaucoup moins nettement lorsque le matériel animal est constitué par des taureaux dont le sperme, employé régulièrement par un Centre d'Insémination en vue de la congélation, porte la marque d'une sélection plus ou moins poussée des animaux et des éjaculats (BARTLETT et ELLIOT, 1960). Il reste à préciser l'importance de ces différences, observées après congélation, relativement à celles qui sont trouvées lors de

l'emploi de sperme frais ainsi que leur liaison avec ces dernières. En particulier lorsque des écarts trop profonds imposent l'élimination de certains taureaux, la détermination de la proportion de tels animaux revêt un intérêt économique évident. D'après HERMANN (1961), au moins 25 p. 100 des taureaux pris au hasard seraient inadéquats aux techniques de congélation.

Devant l'absence, à notre connaissance, d'une démonstration réalisée sur une population de taureaux suffisamment grande, dont le seul critère de choix ait été leur utilisation en Insémination Artificielle, nous avons entrepris la présente étude.

## MATÉRIEL, ET TECHNIQUES

48 taureaux (21 *Frisons* et 27 *Normands*) d'un âge moyen de 3 ans et demi, utilisés pendant 6 mois pour la réalisation de leurs inséminations de testage puis mis au repos, ont été récoltés 4 fois à environ 8 jours d'intervalle, chaque récolte comportant deux éjaculats obtenus sans excitation ni fausse monte préalable.

Le dilueur utilisé est analogue à celui expérimenté par ALMQUIST en 1957.

La fraction non glycérolisée (10 p. 100 de poudre de lait écrémé et 90 p. 100 d'eau distillée en poids) est chauffée pendant 10 mn à 95°C, et après refroidissement, reçoit 500 UI de pénicilline et 0,5 mg de dihydrostreptomycine par ml.

La fraction glycérolisée comprend en volume 80 p. 100 du milieu précédent et 20 p. 100 de glycérol, cette solution étant additionnée de 2,5 g de fructose monohydraté pour 100 ml.

Le dilueur final est formé du mélange à volume égal de chacune des deux fractions.

Le second éjaculat de chaque récolte a été prédilué, placé au réfrigérateur à + 4°C pendant 4 à 6 heures ; puis sa concentration a été ajustée à  $40.10^6$  spermatozoïdes par ml avant glycérolisation pour obtenir une concentration finale de  $20.10^6$  par ml, par l'addition du 1/3 puis des 2/3 de la solution glycérolisée à 30 mn d'intervalle.

Trois heures après glycérolisation, la congélation du sperme ainsi dilué et conditionné en ampoules (2 supports de 4 ampoules par éjaculat) est effectué dans un congélateur à vapeurs d'azote. Des différences importantes ayant été constatées avec cet appareil entre les courbes de descente de température enregistrées à partir d'ampoules occupant des positions différentes, le plan expérimental a été conçu de manière à contrôler la source possible de variation provenant de la position des ampoules dans l'appareil.

L'appréciation du taux de spermatozoïdes mobiles est faite 15 heures après congélation à l'aide d'un microscope à contraste de phase grossissant 150 fois, dont la platine est portée à une température voisine de 39°C. Chaque lecture (faite dans l'ignorance de l'identité de l'échantillon examiné) aboutit à l'appréciation du taux de spermatozoïdes mobiles d'après les examens indépendants de deux ampoules par récolte.

## RÉSULTATS

### *Effets de la congélation*

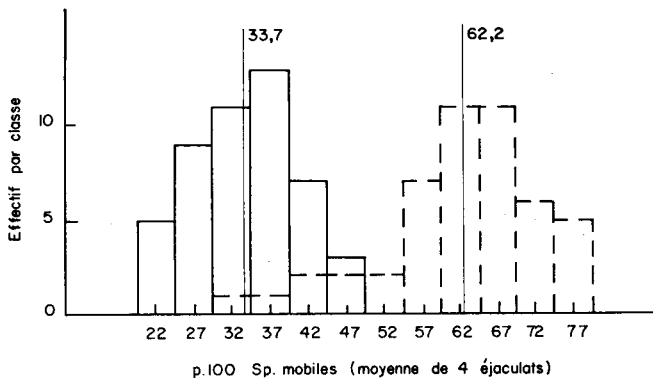
Les résultats de l'étude de la population de taureaux d'après le critère du taux moyen de spermatozoïdes mobiles dans le sperme dilué avant et après congélation sont rassemblés dans le tableau 1 et les graphiques 1 et 2.

La congélation exerce, sur les valeurs initiales du taux de spermatozoïdes mobiles, un effet multiplicatif non absolument rigoureux : Alors que le traitement multiplie en moyenne le pourcentage de spermatozoïdes mobiles par 0,46 (Graphique 2), les écarts-types inter-éjaculats et inter-taureaux sont multipliés par 0,65 (tableau 1).

TABLEAU I

Caractéristiques statistiques (moyenne, écart-type et coefficient de variation) des mesures du taux de spermatozoïdes mobiles avant et après congélation

Traitement	Moyenne	Inter-Éjaculats		Inter-Taureaux	
		Écart-type	Coefficient variation	Écart-type	Coefficient variation
Frais .....	62,2	15,5	0,25	10,6	0,17
Congelé .....	33,7	10,1	0,30	6,95	0,21



GRAPHIQUE I. Effectif de taureaux par classe de motilité moyenne observée sur sperme dilué.  
 — — — sperme frais  
 — — — sperme congelé

TABLEAU 2

Corrélations, pour certains caractères de la motilité, entre sperme frais et sperme congelé, et régressions correspondantes

Mc : p. 100 spermatozoïdes mobiles après congélation

Mf : p. 100 spermatozoïdes mobiles avant congélation

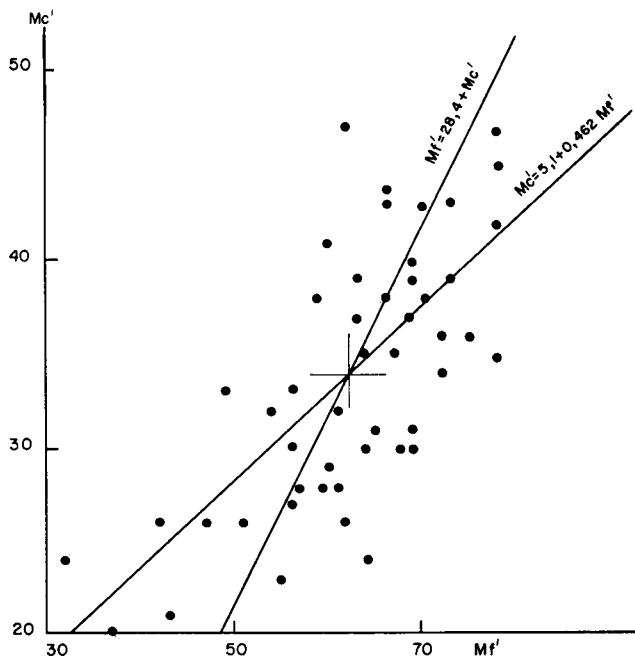
Mi : motilité initiale notée de 0 à 5 sur semence non diluée.

Nombre de données : pour les calculs concernant Mc et Mf, l'absence de 12 données correspond à la destruction intempestive de 12 ampoules après examen de Mf, sans qu'il ait été possible d'identifier les doses examinées.

		Nb données	Corrélations	Régression
Mc et Mf *	Inter-éjaculats	181	$r = + 0,48 \pm 0,06 **$	$Mc = 14 + 0,31 Mf **$
	Inter-taureaux	48	$r' = + 0,68 \pm 0,11 **$	$Mc' = 5 + 0,46 Mf **$
Mc et Mi *	Inter-éjaculats	193	$r = + 0,44 \pm 0,06 **$	$Mc = 20 + 3,5 Mi **$
	Inter-taureaux	48	$r' = + 0,51 \pm 0,13 **$	$Mc' = 20 + 3,6 Mi **$

En outre, la congélation rend homogènes les variances intra-taureaux qui apparaissent hétérogènes avant congélation (test de BARTLETT).

La liaison entre la motilité avant et après congélation pour chaque éjaculat et chaque taureau (moyenne de 4 éjaculats) est exprimée dans le tableau 2. La motilité de la semence fraîche a été appréciée d'une part avant dilution (motilité initiale), d'autre part environ 10 h 30 après dilution et séjour à + 4°C (taux de spermatozoïdes mobiles). Chacune des corrélations calculées est hautement significative, mais les valeurs de chaque coefficient ne diffèrent pas significativement entre elles.



GRAPHIQUE 2. Régression inter-taureaux, du taux de spermatozoïdes mobiles après congélation  $Mc'$  sur le taux de spermatozoïdes mobiles avant congélation  $Mf'$  et vice versa.

## DISCUSSION

La liaison entre motilité avant et après congélation est certaine et s'exprime, lorsqu'on considère les moyennes par taureaux, par une corrélation assez étroite :  $r = + 0,68$ .

Toutefois, les conclusions pratiques qu'on peut tirer de la corrélation indiquée sont limitées par le fait que 6, parmi les 48 taureaux, ont un taux moyen de spermatozoïdes mobiles avant congélation inférieur à 50 p. 100. Ils ne peuvent donc être considérés, d'après les critères habituels, comme « utilisables en Insémination Artificielle ». Si on limite la population étudiée aux 42 sujets « utilisables », 95 p. 100 d'entre eux produisent une semence dont le taux moyen de spermatozoïdes mobiles après congélation est supérieur à 25 et 79 p. 100, une semence pour laquelle ce taux est au moins égal à 30 p. 100.

Cependant la variabilité intra-taureaux est telle qu'une sélection limitée aux seuls taureaux entraîne l'obligation de détruire un nombre relativement élevé d'éjaculats congelés pour lesquels le taux de spermatozoïdes mobiles est inférieur à une valeur considérée comme la plus basse qui soit compatible avec leur utilisation en insémination. Aussi diverses tentatives fictives de sélection des éjaculats et (ou) des taureaux en vue de la congélation ont été essayées dans le but de réduire cette destruction onéreuse. La sélection nous a paru devoir porter à la fois :

— sur le taureau : elle entraîne l'élimination des animaux pour lesquels la moyenne, calculée sur un nombre suffisant d'éjaculats, du taux de spermatozoïdes mobiles après congélation, est inférieure à une valeur limite ;

— sur l'éjaculat : elle se traduit par le rejet des échantillons où le taux de spermatozoïdes mobiles avant congélation est inférieur à une seconde valeur limite.

Dans nos conditions expérimentales, une telle sélection n'est relativement efficace (7 p. 100 seulement des éjaculats congelés devraient être détruits) sans être trop onéreuse (95 p. 100 des taureaux et 86 p. 100 des éjaculats seraient aptes à être employés en congélation) que si la valeur limite acceptable du taux de spermatozoïdes mobiles après congélation n'est pas supérieure à 25 p. 100.

Ce rapport limite de trois spermatozoïdes immobiles pour un mobile semble d'ailleurs assorti d'une certaine marge de sûreté : rappelons que PICKETT (1961-3) utilise toute semence congelée pour laquelle le taux de spermatozoïdes mobiles est supérieur à 17 p. 100, pourvu que chaque dose contienne au moins 10 millions de spermatozoïdes mobiles.

D'ailleurs une expérimentation différente nous indiquera si l'emploi de semence ayant un taux de spermatozoïdes mobiles supérieur ou égal à 20 p. 100 est compatible avec la sauvegarde d'une fécondance suffisante et dans quelles conditions.

*Reçu pour publication en décembre 1963.*

## REMERCIEMENTS

Ce travail a pu être effectué grâce à un fonds de concours de l'U. N. C. E. I. A. et à l'aimable collaboration de l'Administration et du Personnel de la Coopérative d'Élevage et d'Insémination de Centre-Nord (Charmoy) auxquels je tiens à exprimer mes plus vifs remerciements.

## SUMMARY

### THE APTITUDE OF BULLS SUITABLE FOR USE IN ARTIFICIAL INSEMINATION FOR THE PRODUCTION OF SEMEN CAPABLE OF WITHSTANDING FREEZING

Four ejaculates of each of 48 bulls were collected, diluted in a skimmed milk-fructose-glycerol-antibiotics medium, as described by ALMQUIST (1957), and frozen in a nitrogen vapour automatic refrigerator.

The study of the population of the ejaculates according to their motilities (percentage motile spermatozoa) examined before and after freezing led to the following conclusions:

1) the correlations between percentage motile spermatozoa before and after freezing were + 0.48 between ejaculates, and + 0.68 between bulls ( $P < 0.01$ );

2) various imaginary tests of selecting ejaculates and/or bulls have been carried out with respect to freezing.

After prior selection of 42 bulls whose ejaculates before freezing had an average motility greater than 50, it was found that 95 p. 100 of the bulls available in current Artificial Insemination produced a semen whose average percentage of motile spermatozoa after freezing was greater than 25, and that 79 p. 100 of them produced a semen whose average percentage of motile spermatozoa after freezing was greater than, or equal to, 30.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- AMMAN R. P., ALMQUIST J. O., 1957. Freezing of bovine semen II. Effect of milk solids level, glycerol level, and fructose on freezability of bull spermatozoa in reconstituted and fresh skim milk diluents. *J. Dairy Sci.*, **40**, 1542-1549.
- BARTLETT D. E., ELLIOTT F. I., 1960. The constancy of fertility of normal bulls as expressed in artificial insemination. *Internat. J. Fertil.*, **5**, 307.
- BRATTON R. W., FLOOD J. C., FOOTE R. H., WEARDEN S., DUNN H. O., 1957. Fertility of bovine spermatozoa stored at minus 79°C for one week and seventeen weeks. *J. Dairy Sci.*, **40**, 154-162.
- BUCH N. C., SMITH V. R., TYLER W. J., 1956. Bull and line differences in the survival of spermatozoa after freezing and thawing. *J. Dairy Sci.*, **39**, 1712-1716.
- ERICKSON W. E., GRAHAM E. F., 1959. Factors affecting the fertility of frozen bovine spermatozoa. *J. Dairy Sci.*, **42**, 520-528.
- GRAHAM E. F., ERICKSON W. E., BAYLEY N. D., 1959. Effect of glycerol equilibration on frozen bovine spermatozoa. *J. Dairy Sci.*, **40**, 510-515.
- HERMANN H. A., 1961. Broad scale use of frozen semen. *Proc. IV th Internat. Cong. anim. Reprod. The Hague*, 5 th-9th June 1961. IV, 969-971.
- KENNELLY J. J., HOYT R. S., FOOTE R. H., BRATTON R. W., 1960. Survival rates of rapidly frozen bovine spermatozoa. *J. Dairy Sci.*, **43**, 1140-1146.
- O'DELL W. T., ALMQUIST J. O., 1957. Freezing bovine semen. I. Techniques for freezing bovine spermatozoa in milk diluents. *J. Dairy Sci.*, **40**, 1534-1541.
- O'DELL G., HURST V., 1956. The effect of glycerol equilibration time on the freezing of the bovine spermatozoa in egg-yolk sodium citrate and skim milk semen extenders. *J. Dairy Sci.*, **39**, 1156-1160.
- PICKETT et al., 1961. Effects of — 196°C and — 79°C storage on the resistance of bull spermatozoa to three repeated freeze-thaw treatments. *J. Dairy Sci.*, **44**, 715-720.
- PICKETT et al., 1961. Correlation between laboratory stress tests and fertility of frozen bovine spermatozoa. *J. Dairy Sci.*, **44**, 1134-1140.
- PICKETT et al., 1961. Preservation of bovine spermatozoa at — 79°C and — 196°C. *J. Dairy Sci.*, **44**, 2089-2096.