

EFFET DU NOMBRE DE SPERMATOZOÏDES MOBILES UTILISÉS PAR INSÉMINATION, SUR LE POUVOIR FÉCONDANT DU SPERME CONGELÉ DE TAUREAUX

M. GOFFAUX

avec la collaboration technique de J. C. TOURNEUR, Union nationale des Coopératives
d'Élevage d'Insémination artificielle

*Laboratoire de la Physiologie de la Reproduction,
Centre national de Recherches zootechniques, Jouy-en-Josas (Seine-et-Oise)*

SOMMAIRE

Seize éjaculats provenant de 9 taureaux *Charolais* ont été dilués dans un milieu lait écrémé-glycérol et congelés selon un procédé classique au moyen d'un bain d'alcool refroidi à l'aide de glace carbonique. Chaque éjaculat a été divisé en 3 fractions d'égal volume contenant respectivement 24, 31 et 40 millions de spermatozoïdes mobiles par millilitre avant congélation, nombres réduits à 11,0 14,2 et 18,3 millions après congélation.

Huit cent soixante-dix doses (ampoules) en moyenne ont été employées pour chacun des traitements. Les pourcentages de non-retours à 90-120 jours ont été respectivement de 61,6—62,9—66,5. Seule la différence entre les résultats obtenus avec 11,0 et 18,3 millions de spermatozoïdes mobiles après congélation est significative ($P < 0,05$). La tendance indiquée montre que l'emploi du sperme congelé en insémination bovine requiert la présence, au moment de l'intervention, d'un nombre de spermatozoïdes mobiles par dose sensiblement supérieur à la valeur minimum recommandée lorsque le sperme est utilisé à l'état frais.

INTRODUCTION

Il est connu depuis longtemps qu'on peut réduire le nombre total de spermatozoïdes de taureau utilisés à l'état frais à moins de 20 millions par insémination (SALISBURY, 1961) et récemment FOOTE et DUNN, (1962) ont obtenu des pourcentages de non-retours également élevés avec des doses de semence conservées pendant 3 jours et contenant 5 ou 10 millions de spermatozoïdes mobiles au conditionnement.

On peut se demander s'il est possible de généraliser ces conclusions à l'utilisation du sperme congelé, compte tenu du seul nombre de spermatozoïdes mobiles

par dose au moment de l'insémination, puisque ni la longévité, ni l'activité métabolique du spermatozoïde mobile après congélation ne sont équivalentes à celles de son homologue non congelé (O'DELL et ALMQUIST, 1958 ; SULLIVAN et MIXNER, 1963).

ERICKSON et GRAHAM (1959) constatent que des doses de semence renfermant 30 millions de spermatozoïdes mobiles avant congélation montrent un pouvoir fécondant significativement supérieur à celles qui n'en contiennent que 10 millions. Cependant, EMMENS et MARTIN (1961) n'observent aucune différence dans le pouvoir fécondant de doses apportant 13,3 — 20 ou 30 millions de spermatozoïdes totaux par insémination.

L'expérimentation rapportée ici a été réalisée pour éprouver l'effet de 3 concentrations de spermatozoïdes mobiles avant congélation, voisines du maximum (30 millions) cité dans la bibliographie.

MATÉRIEL, ET MÉTHODES

Le dilueur employé est le même que celui décrit précédemment (GOFFAUX, 1964). La composition finale comprend, pour 100 ml : lait (écrémé reconstitué contenant 10 g de matière sèche pour 90 g d'eau), 90 ml ; glycérol, 10 ml ; fructose, 1,25 g ; pénicilline, 45.000 UI ; dihydrostreptomycine 45 mg.

Après sélection, 16 éjaculats provenant de 9 taureaux de race *Char-laise* ont été utilisés, chacun résultant le plus souvent du mélange de 2 échantillons de semence. Seuls ont été retenus pour la congélation les éjaculats montrant un pourcentage de spermatozoïdes mobiles après glycérolisation égal ou supérieur à 50 p. 100 et apportant au minimum 6 milliards de spermatozoïdes totaux. Les éjaculats montrant moins de 20 p. 100 de spermatozoïdes mobiles après congélation ont été éliminés ainsi que ceux pour lesquels plus de 2/3 des spermatozoïdes ont été inactivés au cours de l'opération.

Chaque éjaculat utilisé a été partagé, 1 heure 30 après glycérolisation, en 3 fractions d'égal volume contenant respectivement 24, 31 et 40 millions de spermatozoïdes mobiles par millilitre, et conditionné en ampoules par doses de 1 millilitre. Le temps d'équilibration a été fixé à 4 heures. Les congélations ont été réalisées au moyen d'un bain d'alcool refroidi à l'aide de glace carbonique à raison de 1°C/mn entre + 4°C et — 15°C et de 5°C/mn entre — 15°C et — 70°C.

Les doses ont été conservées à — 196°C pendant 3 à 8 mois. Quatre inséminateurs, préalablement entraînés à la manipulation de sperme congelé, ont reçu, à 6 ampoules près, le même nombre de doses à inséminer pour chaque récolte et chaque traitement. Pour simplifier leur travail, l'ensemble de la semence congelée a été divisée en 3 lots utilisés successivement, chaque lot correspondant aux doses relatives à 3 taureaux. La tenue à jour d'un état de la semence en stock a permis l'utilisation quasi simultanée des doses des 3 traitements pour chaque taureau, évitant toute erreur due à d'éventuelles interactions entre traitement et période d'utilisation ou entre traitement, taureau et période d'utilisation.

RÉSULTATS

La qualité du sperme inséminé est présentée dans le tableau 1 et le tableau 2 indique les données relatives au pouvoir fécondant de la semence pour chacune des 3 concentrations de spermatozoïdes mobiles étudiées.

Malgré la sélection exercée avant et après congélation (sur 50 échantillons de semence récoltés, 35 ont été congelés et 30 ont été finalement retenus en vue de l'insémination) les éjaculats utilisés montrent une chute du pourcentage de spermatozoïdes mobiles supérieure à celle habituellement constatée au cours de l'opération.

TABLEAU I
Caractères des éjaculats utilisés

Caractère	Valeurs extrêmes	Moyennes	Écart type
Pourcentage de spz. mobiles avant congélation (16 éjaculats).....	50-70	61,6	6,1
Pourcentage de spz. mobiles après congélation (16 éjaculats).....	22-35	28,1	4,7
Nombre évalué de spz. mobiles par ml après congélation (10 ⁶)			
24. 10 ⁶ spz. mobiles par ml avant congélation..	8-14	11,0	2,0
31. 10 ⁶ spz. mobiles par ml avant congélation..	10-18	14,2	2,8
40. 10 ⁶ spz. mobiles par ml avant congélation..	13-23	18,3	3,4
Pourcentage de non-retours à 90-120 jours, par éjaculat	45-73	63,4	7,1

TABLEAU 2
Pourcentage de non-retours (90-120 jours) par traitements et taureaux

Taureaux	Nombre de spermatozoïdes mobiles par dose avant congélation						Moyenne		χ^2 par taureau
	24 millions		31 millions		40 millions		nombre insémin. \uparrow_{res}	% non retours	
	nombre insémin. \uparrow_{res}	% non retours	nombre insémin. \uparrow_{res}	% non retours	nombre insémin. \uparrow_{res}	% non retours			
019	76	56,6	76	69,7	78	61,5	230	62,6	2,87
037	65	50,8	62	56,5	71	69,0	198	59,1	4,94
059	128	64,4	125	61,6	120	70,0	373	65,1	2,60
062	125	68,8	132	65,2	131	67,2	388	67,0	0,39
034	154	68,8	149	70,5	155	70,3	458	69,9	0,11
048	148	58,1	134	64,9	146	71,2	428	64,7	5,55
033	30	63,3	29	55,2	40	62,5	99	60,6	0,52
113	90	54,4	91	49,5	91	46,2	272	50,0	1,26
002	50	58,0	50	58,0	56	73,2	156	63,5	3,58
Total	866	61,6	848	62,9	888	66,5	2 602	63,6	21,82

Le pourcentage de non-retours à 90-120 jours varie très significativement selon les taureaux ($\chi^2 = 25,7$ pour 8 DL) et s'élève lorsqu'on augmente le nombre de spermatozoïdes mobiles par dose avant congélation : 61,6 p. 100 pour 24 millions, 62,9 p. 100 pour 31 millions, 66,5 p. 100 pour 40 millions.

Cependant, d'après la valeur trouvée pour la somme des χ^2 particuliers à chaque taureau, la classification des inséminations selon les 3 traitements ne paraît pas

contredire l'hypothèse de l'homogénéité du pouvoir fécondant des doses utilisées (tabl. 3₁). En outre, la valeur de χ^2 calculée sur les totaux montre que les pourcentages de non-retours relatifs aux inséminations correspondant aux 3 traitements ne diffèrent pas significativement. L'hétérogénéité normale indique que les doses de semence paraissent avoir été employées dans des conditions satisfaisantes.

TABLEAU 3

Interprétation de l'effet des traitements

1° Toutes données. Épreuve par taureau. Épreuve sur les totaux. Test de la constance des déviations.

	Degrés de liberté	Valeurs de χ^2
Somme des 9 χ^2 individuels	18	21,82 NS
χ^2 calculé sur les totaux	2	4,88 NS
« Hétérogénéité » ou inconstance des déviations	16	16,94 NS

2° Données limitées aux traitements extrêmes (24.10⁶ et 40.10⁶ spermatozoïdes mobiles avant congélation).

	Degrés de liberté	Valeurs de χ^2
χ^2 calculé sur les totaux	2	4,88* (P < 0,05)

3° Toutes données. Pourcentage de non-retour par traitement après répartition des éjaculats en 2 classes selon le pourcentage de réanimation et χ^2 correspondants pour 2 degrés de liberté. (Le nombre d'inséminations est indiqué entre parenthèses).

Pourcentage de réanimation p	Nombre de spermatozoïdes mobiles avant congélation (10 ⁶ /ml)			Valeurs de χ^2 (2 D L)
	24	31	40	
$p > 50$ %	(298) 68,1 %	(299) 65,2 %	(342) 66,1 %	0,60
$p < 50$ %	(568) 58,1 %	(549) 61,1 %	(546) 66,7 %	8,55** (P < 0,01)

Toutefois, lorsqu'on ne considère que les inséminations réalisées à partir des doses contenant 24 ou 40 millions de spermatozoïdes mobiles avant congélation

(tabl. 3₂), la nouvelle valeur de χ^2 calculée sur les totaux montre que les 2 traitements opposés ont des effets significativement différents ($P < 0,05$).

La répartition des éjaculats en 3 classes, d'après le pourcentage moyen de non-retours pour chacun d'eux, ne permet pas d'affirmer que les traitements ont un effet plus marqué sur les éjaculats montrant un pouvoir fécondant inférieur à une certaine limite.

En revanche, malgré le petit nombre d'inséminations par groupe, la classification des éjaculats selon le pourcentage de réanimation ⁽¹⁾ paraît indiquer que l'effet du nombre de spermatozoïdes mobiles après congélation n'est sensible qu'au-dessous d'un plafond situé entre 10 et 15 millions (tabl. 3₃).

CONCLUSION

Les 3 nombres de spermatozoïdes mobiles avant congélation comparés dans cet essai ont été choisis de telle sorte que l'un d'eux soit nettement supérieur au nombre de 30 millions par millilitre, maximum éprouvé dans l'expérimentation d'ERICKSON et GRAHAM (1959) et nombre généralement considéré comme optimum. Toutefois, en raison de la chute anormalement importante du pourcentage de spermatozoïdes mobiles au cours des congélations réalisées dans l'expérimentation présentée ici, les 3 traitements essayés se retrouvent exactement dans la zone étudiée par ces auteurs lorsqu'on les distingue par le nombre de spermatozoïdes mobiles par millilitre après congélation. Afin d'éviter toute ambiguïté dans l'énoncé des résultats, ce dernier caractère semble donc devoir être retenu de préférence au nombre total de spermatozoïdes ou au nombre de spermatozoïdes mobiles par millilitre de semence avant congélation.

La grande dispersion du nombre de spermatozoïdes mobiles après congélation dans les doses relatives à un traitement donné et le large empiètement réciproque des 3 populations d'insémination qui en résulte (tabl. 1) paraissent avoir eu 2 conséquences opposées contrariant la détermination des effets des traitements :

D'une part le chevauchement des populations d'inséminations est capable d'expliquer l'absence de différence significative entre les 3 traitements considérés dans leur ensemble.

Mais d'autre part, cette dispersion s'est traduite par l'abaissement du nombre de spermatozoïdes mobiles après congélation au-dessous de 10 millions pour le tiers des doses du traitement le moins favorable ; l'examen du tableau 3 suggère que ce seul fait a pu entraîner la constatation d'une différence significative entre les 2 traitements extrêmes.

Le mode de classification des éjaculats selon le pourcentage de réanimation semble reposer sur un critère ambigu, à la fois qualitatif (aptitude à subir la congélation) et quantitatif (nombre de spermatozoïdes mobiles après congélation).

Toutefois, lorsque le nombre de spermatozoïdes mobiles par dose dépasse 10 à 15 millions après congélation, l'examen du tableau 3, montre que le pouvoir

(1) Pourcentage de réanimation : Rapport du nombre de spermatozoïdes mobiles après congélation au nombre de spermatozoïdes mobiles avant congélation.

fécondant est assez peu lié au pourcentage de réanimation et que l'aspect quantitatif du critère est déterminant dans cette expérimentation.

L'ensemble de ces résultats paraît confirmer ceux d'ERICKSON et GRAHAM montrant une différence presque significative entre le pouvoir fécondant des doses contenant 7 ou 14 millions mais pas de différence entre les doses contenant 14 ou 21 millions de spermatozoïdes mobiles après congélation.

Il demeure toutefois que le nombre minimum de spermatozoïdes par dose de sperme congelé se situe assez nettement au-dessus du nombre de 5 millions indiqué par FOOTE et DUNN (1962) pour le sperme frais dilué en C. U. E. Ces résultats, s'ils se confirment, montrent donc qu'il est nécessaire de compenser par l'apport d'une plus grande quantité de cellules, la qualité inférieure des spermatozoïdes mobiles après congélation.

Reçu pour publication en juillet 1965.

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 la Loire (Montrond-les-Bains), organismes auxquels je tiens à exprimer mes plus vifs remerciements

SUMMARY

EFFECTS OF MOTILE INSEMINATED SPERM NUMBER ON THE FERTILIZING ABILITY OF FROZEN BULL SPERM

Sixteen ejaculates from 9 *Charolais* bulls were diluted in a skim milk-fructose-glycerol extender and classically frozen by means of an alcohol-bath and crushed dry-ice. Before ampulling, each ejaculate was divided into 3 portions of equal volume containing respectively 24, 31 and 40 millions motile sperms per milliliter. The inseminations were done by four technicians, each of them receiving the same number of racks for each ejaculate and each treatment.

Of the overall number of 2 602 first services, 866 were made with 24 million, 848 with 31 millions, 888 with 40 millions motile sperms before freezing. The corresponding non-return rate for 90-120 days were 61.6-62.9 and 66.5 respectively. Only the difference between the 24 million and the 40 million lots was significant ($P < 0.05$).

Because of the deep fall in the percentage of motile sperms during the freezing process, possibly owing to the fact that no selection on freezability had been preliminarily made, the 3 treatments expressed in terms of numbers of motile sperms after freezing, come down to 11.0; 14.2 and 18.3.

The trend indicated by the experiment agrees with the previous report of ERICKSON and GRAHAM (1959) and shows that the minimum sperm number required for an insemination is definitely higher when frozen semen is used as compared with fresh semen.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- EMMENS C. W., MARTIN I., 1961. The effects of equilibration period and sugar content of the diluent on the survival and fertility of bull spermatozoa deep-frozen to -79°C . *IVth Inter. Congr. animal. reprod. artif. insemin.* The Hague.
- ERICKSON W. E., GRAHAM E. F., 1959. Factors affecting the fertility of frozen bovine spermatozoa. *J. Dairy Sci.*, **42**, 520-528.

- FOOTE R. H., DUNN H. O., 1962. Motility and fertility of bull semen extended at high rates in yolk extender containing catalase. *J. Dairy Sci.*, **45**, 1237-1241.
- GOFFAUX M., 1964. Aptitude des taureaux utilisés en insémination artificielle à la production de semence capable de supporter la congélation. *Ann. Zootech.*, **13**, 87-92.
- O'DELL W. T., ALMQUIST J. O., 1958. Freezing bovine semen. IV. Effect of freezing on the metabolic activity of bovine spermatozoa during and after storage at -79°C . *J. Dairy Sci.*, **41**, 1792-1799.
- SALISBURY G. W., Van DEMARK N. L., 1961. *Physiology of reproduction and artificial insemination of cattle*, 434-435. W. H. Freeman and Co. San Francisco and London.
- SULLIVAN J. J., MIXNER J. P., 1963. Effects of storage temperature and length of storage time upon the post thawing motility and metabolic activity of frozen bull sperm. *J. Dairy Sci.*, **46**, 850-853.
-