

EFFETS COMPARÉS D'UN TAMPON-CITRATE ASSOCIÉ AU JAUNE D'ŒUF ENTIER OU CHIMIQUEMENT FRACTIONNÉ SUR LA SURVIE *IN VITRO* DES SPERMATOZOÏDES DE BOUC

J.-M. CORTEEL

avec la collaboration technique de F. BARITEAU

*Laboratoire de Physiologie de la Reproduction,
Centre de Recherches vétérinaires et zootechniques, 37 - Nouzilly,
Centre expérimental de Sélection et d'Insémination porcine,
La Pétrinière, 86 - Rouillé*

SOMMAIRE

Les effets de trois associations différentes de citrate trisodique et de jaune d'œuf sur la survie *in vitro* des spermatozoïdes de bouc ont été comparés. Seul parmi les milieux de dilution utilisés, le citrate trisodique associé au précipité acétonique de jaune d'œuf et aux antibiotiques a permis une conservation efficace de la motilité des spermatozoïdes de bouc. 193 chèvres ont été inséminées avec du sperme dilué dans ce milieu; les résultats obtenus n'ont pas été satisfaisants.

INTRODUCTION

A la suite des travaux de PHILLIPS (1939), le vitellus de l'œuf de poule a été très largement utilisé dans les milieux de conservation *in vitro* des spermatozoïdes de Taureau. Par contre, son utilisation pour le bouc a conduit à des résultats très variables (BUHMAN, 1952; KNOBLAUCH, 1952; BLOKHUIS, 1959; SINGH, 1961; DAUZIER, 1962 et VLACHOS, 1963).

Les échecs semblent liés à la dégradation de la molécule de lécithine du jaune d'œuf par un enzyme présent dans le plasma séminal de bouc (ROY, 1957) ; cet enzyme qui scinde la molécule de lécithine du jaune d'œuf en lysolécithine et en acides gras, provoque la coagulation du milieu de conservation (IRITANI *et al.*, 1961 à 1965).

L'analyse de ces phénomènes a permis aux auteurs japonais de montrer que, soumise à l'activité enzymatique du plasma séminal, la fraction du jaune d'œuf insoluble dans l'acétone libérait un taux d'acides gras trois fois moindre que le jaune d'œuf entier non traité. Il nous a paru intéressant d'étudier l'influence respective de différentes fractions du jaune d'œuf sur le survie *in vitro* des spermatozoïdes de bouc.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Quatre essais de conservation ont lieu successivement à une semaine d'intervalle au cours des mois de janvier et février. Nous disposons de quatre boucs, âgés de 2 à 6 ans soumis à un rythme de collecte bi-hebdomadaire. Le matin de chaque essai, chacun des quatre boucs est collecté deux fois. L'ensemble des collectes a lieu dans un laps de temps aussi bref que possible (20 minutes environ).

La motilité d'ensemble du sperme de chaque éjaculat est appréciée. Lorsqu'ils obtiennent une note au moins égale ou supérieure à 3,5 (échelle de 0 à 5), les éjaculats sont mélangés pour constituer le volume de sperme nécessaire à chaque essai. 24 éjaculats sont ainsi sélectionnés et utilisés au cours de notre expérience (5 pour le premier essai, 6 pour le second, 7 pour le 3^e et 6 pour le dernier).

Lors de chaque essai, le pourcentage de spermatozoïdes non colorés est déterminé pour le sperme résultant du mélange des éjaculats retenus. Fractionné en trois volumes égaux, le sperme est alors dilué à + 35°C dans trois milieux différents à raison d'un volume de semence pour 10 volumes de dilueur. Trois milieux de conservation sont utilisés :

Dilueur A : Citrate trisodique (2 H₂O) à 2,9 p. 100 (48 ml) ; *jaune d'œuf frais* (12 ml) ; Streptomycine (30 mg) ; Pénicilline (18 mg) ; pH ajusté à 6,80.

Dilueur B : Citrate trisodique (2 H₂O) à 2,9 p. 100 (56,5 ml) *précipité acétonique de jaune d'œuf* (3,4 g) ; Streptomycine (30 mg) ; Pénicilline (18 mg) pH ajusté à 6,80.

Dilueur C : Citrate trisodique (2 H₂O) à 2,9 p. 100 (58,5 ml) ; *Phospholipides du jaune d'œuf* (1,334 g) ; Streptomycine (30 mg) ; Pénicilline (18 mg) ; pH ajusté à 6,80.

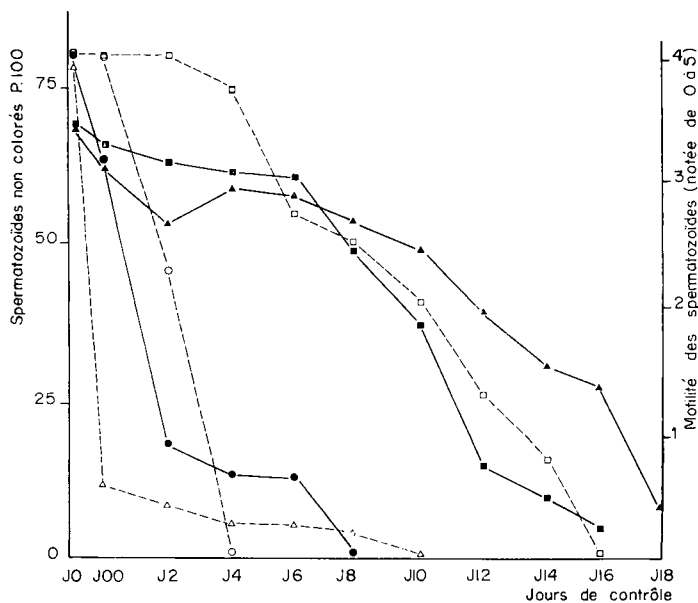
Le sperme dilué et refroidi (linéairement à raison de 15°C heure) est réparti dans des ampoules de verre qui après avoir été scellées à la flamme sont conservées à la chambre froide (+ 5°C). Une ampoule par traitement est prélevée le jour de la collecte pour notation de la motilité et détermination du pourcentage de spermatozoïdes non colorés (valeurs portées en Joo sur le graphique). Les examens se poursuivent ensuite tous les deux jours pendant 18 jours.

RÉSULTATS

Au cours des contrôles, le coagulum a été observé dans la dilution A après huit jours de conservation au cours du premier essai et après deux jours dans les trois autres essais. Dans tous les cas l'apparition du coagulum a été suivie de la mort plus ou moins immédiate des spermatozoïdes.

Le dilueur B a permis une survie des spermatozoïdes de 12 à 16 jours suivant les essais sans coagulation apparente du milieu.

Enfin, en l'absence de coagulation, on constate dans le dilueur C une dissociation très nette entre l'évolution dans le temps du pourcentage de spermatozoïdes non colorés et celle de la motilité : 6 heures après la dilution on n'observe plus que quelques spermatozoïdes animés de mouvements pendulaires, de faible amplitude, alors que le pourcentage de spermatozoïdes non colorés est d'environ 60 p. 100.



Survie in vitro des spermatozoïdes de Bouc dans différents milieux de conservation.

Dilueurs : A = \circ B = \square C = \triangle
 P. 100 de spermatozoïdes non colorés = - - - - Motilité = - - - -

DISCUSSION

Au cours de conservations *in vitro* dans les milieux à base de jaune d'œuf frais, WAGNER (1949) ; HAMPEL (1951), AEHNEIT et BROCKMANN (1955), BROCKMANN (1956) et NICOLAI (1957) ont observé des survies de 200 heures.

Au cours de nos essais, la formation du coagulum dans le dilueur A s'est produite après des temps de conservation variables.

Selon ROY (1957), le retard ou même l'absence de réaction enzymatique serait due à un défaut de Calcium, activateur de la réaction. Le plasma séminal et le jaune d'œuf contenant tous deux du Calcium, l'explication de ROY semble devoir être nuancée : des effets de seuils pourraient intervenir ici.

Le dilueur B a permis le maintien d'une motilité nettement supérieure à celle des témoins.

Dans le milieu contenant les phospholipides du jaune d'œuf, on assiste à une immobilisation immédiate des spermatozoïdes. AAMDAL, LYGSET et FOSSUM (1965) obtiennent le même type de réaction en ajoutant 1 à 2 p. 100 de coagulum ou de la lysolécithine au taux de 1 p. 1 000 au sperme de bouc et de verrat.

Le maintien d'un haut pourcentage de spermatozoïdes non colorés au cours de la conservation dans le milieu C ouvre la voie à de nombreuses hypothèses : ou les spermatozoïdes sont morts et leur non coloration serait due à des modifications de la membrane cellulaire inhibant la coloration ou, en l'absence de nécrospémie, s'agit-il plus simplement d'une inhibition réversible ou non de la motilité des spermatozoïdes ?

CONCLUSION

Seul parmi les milieux de dilution utilisés, le tampon citrate associé au précipité acétonique de jaune d'œuf et aux antibiotiques a permis une conservation efficace de la motilité des spermatozoïdes de bouc. Il restait à confirmer la valeur de ce dilueur par des essais de fécondance pratiqués à l'aide de sperme ainsi conservé.

Pour les essais *in vivo*, le principe des éjaculats partagés n'a pu être maintenu en raison de considérations zootechniques et pratiques.

TABLEAU I
Essai de fécondance

Chèvres vides après 1 insémination	Ont mis bas après 1 insémination	Nombre de chèvres inséminées 1 fois	Taux de mise bas exprimé en p. 100
141	52	193	26,94

Néanmoins 193 chèvres ont été inséminées par dépôt intravaginal de 0,4 ml de sperme dilué contenant 150×10^6 spermatozoïdes. Les résultats, exprimés en nombre de chèvres ayant mis bas après une seule insémination, figurent au tableau I. Ceux-ci sont en moyenne inférieurs de 25 p. 100 aux résultats obtenus pendant la même saison en utilisant un dilueur à base de lait de vache, *écrémé, reconstitué* (DAUZIER, 1962). Les temps de conservation étaient identiques (≤ 12 h).

Les interactions du plasma séminal de bouc avec les différents constituants du jaune d'œuf sont encore mal connues et méritent d'être précisées. Par ailleurs les essais de fécondance confirment la faible relation entre la survie *in vitro* et la « fécondance » du sperme de bouc.

Reçu pour publication en janvier 1967.

SUMMARY

SURVIVAL OF HE-GOAT SPERMATOZOA IN WHOLE OR FRACTIONATED EGG-YOLK ASSOCIATED WITH A SODIUM CITRATE BUFFER SOLUTION AND ANTIBIOTICS

Whole egg yolk, yolk crude phospholipids and yolk phospholipids associated to yolk proteins have been added to a sodium citrate buffer solution and to antibiotics in an attempt to extend the volume of ejaculated goat semen and to preserve the motility of the spermatozoa at $+4.5^{\circ}$ C. Sperm survival has been checked every other day from collection time through extinction of spermatozoal life.

The sodium citrate dilutor containing yolk proteins associated to yolk crude phospholipids proved to be the best for the preservation of sperm motility. However when used for the insemination of 193 goats, the results have been unsatisfactory.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- AAMDAL J., LYGSET O., FØSSUM K., 1965. Toxic effect of lysolecithin on sperm. A preliminary report. *Nord Vet. Med.*, **17**, 633-634.
- AEHNELT E., BROCKMANN P., 1955. Zur spermaverdünnung unter Verwendung von eidottern verschiedener hühnerrassen. *Dtsch. Tier Wochs.*, **5**, 69-72.
- BLOKHUIS J., 1959. Kunstmatige inseminatie bij geiten in de provincie Utrecht. *Tijdschr. Diergeneesk.*, **6**, 347-351.
- BROCKMANN P., 1956. Der einfluss von eidotter verschiedener Hühnerrassen auf die lebensdauer von ziegenbock- und bullensperma sowie befruchtungsfähigkeit von ziegenbocksperma. *Inaug. Diss. Hannover.*
- BUHMANN K., 1952. Samenübertragung bei ziegen : Verdünnungs- und Fütterungsversuche. *Inaug. Diss. Hannover.*
- CORTEEL J. M., 1966. Reproduction et Insémination artificielle de l'espèce Caprine. *Bull. tech. Inform.*, **210**, 463-471.
- DAUZIER L., 1962. *Quelques résultats sur l'insémination artificielle caprine.* Intern. Encyclopaedia Vet. Stud. r. School vet. Stud. Edinburgh.
- HAMPEL J., 1951. Versuche zur verdünnung des ziegenspermas. *Inaug. Diss. Hannover.*
- IRITANI A., NISHIKAWA Y., FUKUHARA R., 1961. Studies on the egg-yolk coagulating factor in goat semen. I. Localisation of the C. F. and decline of pH following coagulation. *Proc. Silver Jubilee : lab. anim. Husband. Coll. Agric. Kyoto*, 89-96.
- IRITANI A., NISHIKAWA Y., 1961. Studies on the egg-yolk coagulating factor in goat semen. II. Properties of the coagulating factor and influential conditions for coagulation. *Proc. Silver Jubilee : lab. Anim. Husb. Coll. Agric. Kyoto*, 97-104.
- IRITANI A., NISHIKAWA Y., 1963. Studies on the egg-yolk coagulating factor in goat semen. III. Release of some acids accompanied by the coagulation phenomena. IV. On the position of yolk constituents attacked by the coagulating enzyme. V. Purification of the egg-yolk coagulating enzyme. *Jap. J. anim. Reprod.*, **8**, 109-121.
- IRITANI A., NISHIKAWA Y., 1964. Studies on the egg-yolk coagulating enzyme in goat semen. VI. On the chemical properties of the ejaculated semen and the secretion of accessory sexual organs in the goat VII. Variations in the enzyme activity of the semen between breeding and non breeding season and in each ejaculate. VIII. The enzyme activity of the semen collected by electrical stimulation and the semen depleted by the artificial vagina. *Jap. J. anim. Reprod.*, **10**, 44-62.
- KNOBLAUCH H., 1952. Untersuchungen an ziegenbockejaculaten. *Zuchthyg.*, **6**, 9-22.
- NICOLAI E., 1957. Verdünnungs und besamungsversuche (Riedel de Haen-Verdunner D) Sowie Fütterungsversuche. *Inaug. Diss. Hannover.*
- PHILLIPS P. H., 1939. The preservation of Bull semen. *J. biol. Chem.*, **130**, 415.
- ROY A., 1957. Egg yolk coagulating enzyme in the semen and cowper's gland of the goat. *Nature*, **179**, 378.
- SINGH G., 1961. Observations sur l'application pratique de l'insémination artificielle chez les bovins, les buffles, les chèvres à Izatnagar (Inde). *Ann. Zootech.*, **10**, 229-232.
- VLACHOS K., 1963. Untersuchungen über die erfolge kunstlicher besamung der ziegen in nordgriechenland während des Jahres 1961. *Zuchthyg.*, **7**, 214-224.
- WAGNER H., 1949. Erfahrungen und versuche in der ziegen-besamung. *Inaug. Diss. Hannover.*