

Effet du nombre de spermatozoïdes sur la fertilité de la semence conservée 24 heures chez le lapin

Maria-Pilar Viudes de Castro^a, José-Salvador Vicente^{b*},
Raquel Lavara^b

^a División de Producción Animal, Dpto de Tecnología Agroalimentaria, EPSO, Universidad Miguel Hernández, Ctra Beniel Km 3.2, 03312 Orihuela, Alicante, Espagne,

^b Laboratorio de Biotecnología de la Reproducción, dto de Ciencia Animal, ETSIA, Universidad Politécnica de Valencia, Camino de Vera 14, 46071 Valence, Espagne

(Reçu le 17 septembre 1998 ; accepté le 23 juin 1999)

Abstract — **Effect of conservation time and number of rabbit spermatozoa on fertility.** The effect of conservation time and number of rabbit spermatozoa on fertility and prolificity were determined. In the first assay, the fertility of spermatozoa conserved 0–4 h, 10–14 h and 26–30 h from semen pools at 12 and 24 millions per mL (6 and 12 millions by insemination dose) was evaluated on lactating multiparous does. A dose of 12 millions of spermatozoa refrigerated at 16–18 °C for 26–30 h showed a similar fertility rate than 6 millions of spermatozoa at 0–4 h (80.6 % and 82.7 %, respectively). In the second assay, seminal parameters between spermatozoa fresh and refrigerated, and fertility and prolificity rate according to the reproductive status of does were evaluated. No differences were observed in the seminal parameters (normal acrosome rate: 92 %, motility rate: 75 %, curvilinear rate-VCL-: 41 $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$, linear index: 57 %), fertility at birth (76 %) and prolificity (9.6 alive born) between fresh and refrigerated semen. (© Elsevier / Inra).

rabbit / refrigeration / number of spermatozoa / semen

Résumé — L'effet de la durée de conservation du sperme de lapin et de sa concentration en spermatozoïdes sur la fertilité et la taille de portée a été étudié. Dans un premier essai, 6 et 12 millions de spermatozoïdes par dose ont été inséminés après 0–4, 10–14 et 26–30 h de conservation à 16–18 °C. Le taux de fertilité mesuré sur des lapines en œstrus ou préalablement traitées avec de la PMSG montre qu'une dose de 12×10^6 spermatozoïdes conservée 26–30 h est une concentration suffisante pour obtenir des résultats satisfaisants (80,6 %). Dans un second essai, la conservation à 16–18 °C pendant 26–30 h de la semence diluée jusqu'à 12×10^6 par dose d'insémination montre qu'il n'y a pas de différence de fertilité et de taille de la portée entre la semence fraîche et conservée

* Correspondance et tirés à part.

Tél. : 34 96 387 94 35 ; fax : 34 96 387 74 39 ; e-mail : JVicent@dca.upv.es

(78,9 % et 9,6 nés vivants, respectivement) et entre les paramètres de motilité enregistrés (normalité acrosomique : 92 %, motilité : 75 %, vitesse curvilinéaire-VCL- : $41 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$, taux de linéarité-LIN- : 57 %). (© Elsevier / Inra).

lapin / conservation / nombre de spermatozoïdes / semence

1. INTRODUCTION

La possibilité de conserver la semence pendant 24 à 72 h améliorerait l'organisation des centres de diffusion de semence de lapin. Une diminution de la température permet d'augmenter la durée de conservation tout en préservant la capacité fécondante du sperme. De nombreux travaux ont étudié cet effet sur la conservation de la motilité ; Mathur et al. [6], Gottardi [4] et López et al. [5] ont observé qu'une température de conservation comprise entre 15 et 19 °C est la plus favorable à la survie des spermatozoïdes. De bons résultats de fertilité et de prolificité ont aussi été obtenus avec du sperme conservé pendant 24–72 h [1, 2, 5 et 7] avec des doses d'insémination comprenant un nombre important de spermatozoïdes (entre 26 et 48×10^6).

L'objectif de notre étude est de définir la dose optimale d'insémination quand la semence est conservée 24–30 h à 16–18 °C, afin d'obtenir une diffusion maximale de lapins sélectionnés pour leur vitesse de croissance.

2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

Des mâles du centre de sélection de l'université polytechnique de Valence (UPV) appartenant à une souche sélectionnée dès 1984 pour sa vitesse de croissance ont été utilisés (lignée R, [3]). Les mâles ont été sollicités deux fois, à environ 15 min d'intervalle, un jour par semaine. Le prélèvement de la semence a été effectué avec un vagin artificiel. Après récolte, l'éjaculat a été dilué cinq fois avec un dilueur composé du Tris[hydroxyméthyl]aminométhane (0,25 M, Sigma), acide citrique (88 mM, Sigma) et glu-

cose (47 mM, Sigma) et la motilité de chaque échantillon a été appréciée à 37 °C (pourcentage de spermatozoïdes qui ont un mouvement progressif), à l'aide d'un moniteur connecté au microscope, par deux observateurs expérimentés. Les éjaculats pour lesquels la plupart des spermatozoïdes (70 % minimum) présentent un mouvement linéaire progressif ont été mélangés. Une fraction du mélange hétérospermique a été diluée dix fois et fixée pour la détermination de la concentration en spermatozoïdes sur cellule de Thoma. Les caractéristiques morphologiques ont été évaluées par contraste interférentiel de Nomarski (pourcentage de spermatozoïdes avec l'acrosome normal et pourcentage de spermatozoïdes avec anomalies morphologiques, à des grossissements de $1\,200\times$ et $750\times$ respectivement).

Les lapines croisées de souche commerciale, conduites en six bandes, étaient inséminées tous les 7 j. Deux jours avant l'insémination les femelles étaient contrôlées : celles qui présentaient une vulve blanche recevaient 12 U.I. de PMSG (Gonaser, Hipra) par injection sous-cutanée. Les femelles vides 12 j après l'insémination recevaient 0,2 mL de cloprostenol (Planate, Schering-Plough) par injection intramusculaire. Les femelles réceptives étaient inséminées avec 0,5 mL de sperme. L'ovulation était induite au moment de l'insémination par une injection intramusculaire de 0,8 μg d'acétate de buséreline (Hoechst).

2.1. Expérience 1 :

Effet de la concentration et de la durée de conservation des spermatozoïdes sur la fertilité

Après la détermination de la concentration, la semence était diluée afin d'obtenir 12 et 24 millions de spermatozoïdes totaux par millilitre (6 et 12 millions par dose d'insémination) et la semence était conditionnée dans quatre flacons et conservée à 16–18 °C jusqu'au moment de

l'insémination (0–4, 10–14 et 26–30 h après la récolte).

Les lapines étaient des multipares allaitantes et ont été réparties entre les quatre traitements suivantes :

a) Lot 1 (témoin) : insémination avec 6 millions de spermatozoïdes immédiatement après la récolte (0–4 h).

b) Lot 2 : insémination avec 6 millions de spermatozoïdes 10–14 h après la récolte.

c) Lot 3 : insémination avec 12 millions de spermatozoïdes 10–14 h après la récolte.

d) Lot 4 : insémination avec 12 millions de spermatozoïdes 26–30 h après la récolte.

Nous avons considéré le pourcentage de fertilité au moment de la palpation (12 j après l'insémination). Le taux de fertilité a été analysé par un test de χ^2 .

2.2. Expérience 2 :

Conservation de la semence pendant 26–30 h et insémination avec 12 millions de spermatozoïdes

Les mâles ont été répartis en deux groupes (cinq mâles par groupe) : l'un pour obtenir la semence à conserver, l'autre pour obtenir la semence fraîche. Chaque semaine les mâles changeaient de groupe. La semence était diluée afin d'obtenir 12 millions de spermatozoïdes totaux par dose d'insémination pour la semence à conserver et 6 millions par dose pour la semence fraîche. Elle était conservée à 16–18 °C jusqu'au moment de l'insémination 26–30 h après le prélèvement dans le premier cas et 0–4 h dans le second. Une fraction de chaque mélange hétérospermique était placée dans une cupule pour évaluer les caractéristiques de motilité 0–4 et 26–30 h après conservation. Pour chaque échantillon, deux gouttes de 5 μ L de semence diluée ont été placées sur la platine chauffante du microscope à 37 °C ; après 2 min l'acquisition des images a été effectuée (deux champs par goutte). Le logiciel utilisé pour analyser les images était le SCA (Sperm Class Analyser v3.0, Microptic, Barcelona). Après l'évaluation automatique des échantillons avec le filtrage Auto-M, les images ont été révisées et les particules incorrectement identifiées ont été dénombrées afin de recalculer les différents paramètres de motilité. Les paramètres étudiés ont été les suivants :

– VAP : distance parcourue par la tête des spermatozoïdes par unité de temps ($\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$) ;

– VCL : distance parcourue au cours de la trajectoire curvilinéaire par la tête du spermatozoïde par unité de temps ($\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$) ;

– VSL : distance parcourue en ligne droite entre le commencement et la fin de la trajectoire curvilinéaire décrite par la tête du spermatozoïde par unité de temps ($\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$) ;

– LIN : indique la linéarité de la trajectoire curvilinéaire (%) ;

– STR : indique la rectitude de la trajectoire moyenne (%) ;

– WOB : indique le degré d'oscillation de la trajectoire curvilinéaire par rapport à la trajectoire moyenne (%) ;

– ALH : indique le déplacement observé par la tête du spermatozoïde par rapport à la trajectoire moyenne (μm).

Les lapines ont été distribuées de façon homogène en tenant compte de leur stade physiologique (nullipares, primipares allaitantes, multipares allaitantes et non allaitantes) et ont été réparties entre les deux traitements suivants :

a) insémination artificielle avec de la semence fraîche : 6 millions de spermatozoïdes par dose, 0–4 h après la récolte ;

b) insémination artificielle avec de la semence réfrigérée : 12 millions de spermatozoïdes par dose, 26–30 h après la récolte.

Les différents paramètres de motilité de la semence ont été analysés par Anova pour observer leur évolution temporelle au cours du processus de conservation.

Les taux de fertilité (12 j après l'insémination) et de mise bas ont été analysés par un test χ^2 . Le nombre de lapereaux nés totaux et nés vivants pour les effets fixes groupe et stade physiologique des femelles et leur interaction ont été analysés avec le PROC GLM de SAS [10].

3. RÉSULTATS

Expérience 1 : 863 inséminations ont été réalisées. Les résultats obtenus dans les quatre lots diffèrent significativement en fonction de la durée de conservation et du nombre de spermatozoïdes par dose. Cependant, pour une conservation de 10–14 et 26–30 h, 12×10^6 de spermatozoïdes par dose d'insémination permettent d'assurer une fertilité de même niveau qu'une insé-

mination de 6×10^6 de spermatozoïdes, 0–4 h après récolte (*tableau I*). En revanche, une dose de 6×10^6 de spermatozoïdes entraîne des taux de fertilité inférieurs après 10–14 h de conservation.

Nous avons donc considéré que la dose de 12×10^6 spermatozoïdes permet un bon maintien du pouvoir fécondant à 18 °C pendant 26–30 h.

Expérience 2 : Les paramètres de motilité d'un total de 40 échantillons ont été déterminés avec le SCA, les échantillons correspondant à la semence conservée à 18 °C ont été étudiés après 0–4 et 26–30 h de conservation. Il n'y a pas eu de différences significatives pour les paramètres étudiés entre les deux temps de conservation (*tableau II*). Les caractéristiques de normalité acrosomique, anomalies morphologiques, motilité et concentration n'ont pas

varié entre groupes ($92 \pm 1 \%$, $6 \pm 0,7 \%$, $75 \pm 2 \%$ et 200×10^6 , respectivement) et ont été semblables à celles décrites dans d'autres études [13].

Au total, 1 942 inséminations ont été effectuées. Il n'y a pas eu de différences significatives entre le taux de fertilité et la taille de portée entre semence fraîche et conservée. En revanche, l'état physiologique des lapines au moment de l'insémination a influencé significativement la fertilité. En effet, les femelles nullipares et primipares allaitantes ont eu un taux de fertilité supérieur aux autres femelles ; le groupe le moins fertile étant constitué par les multipares allaitantes (90,2 et 84,2 vs 75 % pour les nullipares, primipares allaitantes et multipares allaitantes respectivement ; *tableau III*), les lapines non allaitantes ont eu une fertilité de même niveau que les multipares et les primipares allaitantes (80 %). Le taux de

Tableau I. Effet du nombre de spermatozoïdes et de la durée de conservation du sperme sur la fertilité. Expérience 1.

	Lot 1 (6×10^6 et 0–4 h)	Lot 2 (6×10^6 et 12 h)	Lot 3 (12×10^6 et 12 h)	Lot 4 (12×10^6 et 24 h)
Nombre d'inséminations	434	128	162	139
Taux de fertilité (%)	82,7 ^a	70,3 ^b	78,4 ^a	80,6 ^a

^{a,b} : les moyennes suivies de lettres différentes diffèrent significativement au seuil de $p < 0,05$.

Tableau II. Paramètres de motilité des spermatozoïdes. Expérience 2.

	VAP $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$	VCL $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$	VSL $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$	LIN %	STR %	WOB %	ALH μm
Semence conservée :							
0–4 h ¹	26 ± 1,6	39 ± 3	22 ± 1,4	59 ± 2,0	82 ± 1,2	68 ± 2,0	1,3 ± 0,15
26–30 h ²	26 ± 1,5	42 ± 3	21 ± 1,4	56 ± 2,0	79 ± 1,0	67 ± 2,0	1,5 ± 0,14
Semence fraîche : 0–4 h ¹	25 ± 1,5	42 ± 3	19 ± 1,4	57 ± 2,0	79 ± 1,0	67 ± 2,0	1,6 ± 0,14

¹ Mesures de la semence conservée au moment du prélèvement.

² Mesures de la semence conservée au moment de l'insémination.

Tableau III. Résultats de fertilité et de prolificité en fonction de la durée de conservation de la semence et de l'état physiologique de la lapine au moment de l'insémination. Expérience 2.

	Effectifs	Taux de fertilité (%)	Taux de mise bas (%)	Nés totaux (LSM ± SE)	Nés vivants (LSM ± SE)
Semence fraîche	1 328	78,9	76,0	10,1 ± 0,12	9,6 ± 0,12
Semence conservée	613	78,9	75,9	10,0 ± 0,24	9,6 ± 0,25
État physiologique					
Nullipares	266	90,2 ^c	84,6 ^b	10,0 ± 0,24	9,1 ± 0,25
Primipares allaitantes	259	84,2 ^{bc}	83,4 ^b	10,2 ± 0,24	9,8 ± 0,26
Multipares allaitantes	1 247	75,0 ^a	72,1 ^a	10,2 ± 0,11	9,7 ± 0,11
Non allaitantes	170	80,0 ^{ab}	79,1 ^{ab}	10,1 ± 0,39	9,7 ± 0,41

^{a,b,c} : les moyennes d'une même colonne suivies d'une lettre différente diffèrent significativement au seuil de $p < 0,05$.

mise bas a été semblable entre femelles nullipares, primipares allaitantes et non allaitantes ; celui des femelles multipares allaitantes a été significativement inférieur à celui des nullipares et primipares allaitantes (*tableau III*). La taille de la portée à la naissance n'a pas été influencée par la conservation de la semence (10,1 et 9,6 nés totaux et nés vivants respectivement, *tableau III*) ni par l'état physiologique des lapines.

4. DISCUSSION

L'intérêt de conserver la semence de lapin pendant une période de 24–72 h a fait l'objet de plusieurs essais durant ces dernières années [1, 2, 4–7, 9]. Le nombre de spermatozoïdes nécessaire pour ne pas affecter le taux de fertilité et la prolificité de la femelle est relativement très élevé : entre 20 et 48 millions. Il en résulte que le nombre de doses par mâle est réduit (8–12 doses). Avec la semence fraîche il est possible d'avoir de bons résultats avec un nombre de 6–7 millions de spermatozoïdes [8, 11–13] et en conséquence, il est possible d'augmenter le nombre de doses d'insémination par mâle. Dans le schéma de production des élevages commerciaux, il est important d'introduire de la semence de mâles sélectionnés pour améliorer génétiquement

les animaux et maintenir la qualité de la production. Les résultats obtenus dans ce travail montrent qu'il est possible d'utiliser 26–30 h après le prélèvement, une dose de 12×10^6 de spermatozoïdes en employant un milieu de dilution très simple à une température de conservation de 16–18 °C ; ce qui accroît les possibilités de diffusion des mâles sélectionnés. D'autre part, l'évaluation des caractéristiques de motilité de la semence conservée durant 0–4 et 26–30 h démontre que la température et l'intervalle de conservation employés n'affectent pas les différents paramètres de motilité des spermatozoïdes.

5. CONCLUSION

Dans nos conditions expérimentales, 12×10^6 de spermatozoïdes conservés 26–30 h dans un milieu de dilution très simple à 16–18 °C, permet d'obtenir sur des lapines réceptives des niveaux de fertilité et de prolificité identiques à l'insémination de semence fraîche.

REMERCIEMENTS

Ce travail a été financé par le projet CICYT AGF95-0850.

RÉFÉRENCES

- [1] Alvariño J.M.R., López F.J., Del Arco J.A., Delgado F., Artificial insemination of rabbit with diluted semen stored for 24 hours. 6th World Rabbit Congress, Toulouse, 9–12 juillet 1996, Vol. 2, pp. 37–40.
- [2] Alvariño J.M.R., López F.J., Del Arco J.A., Bueno A., Torres R., Effects of semen concentration on rabbit artificial insemination with fresh or 24 hours stored semen. 6th World Rabbit Congress, Toulouse, 9–12 juillet 1996, Vol. 2, pp. 33–35.
- [3] Estany J., Camacho J., Baselga M., Blasco A., Selection response of growth rate in rabbits for meat production, *Genet. Sel. Evol.* 24 (1992) 527–537.
- [4] Gottardi L. Conservazione a medio-lungo periodo del materiale seminale di coniglio. Mezzi di diluizione e temperature, *Rivista de Coniglicoltura* 5 (1993) 31–38.
- [5] López F.J., Alvariño J.M.R., Del Arco J.A., Delgado F., Ramiro J.L. Effect of cooling temperature on 24 hours stored semen for artificial insemination of rabbits, 6th World Rabbit Congress, Toulouse, 9–12 juillet 1996, Vol. 2, pp. 79–81.
- [6] Mathur A.K., Srivastava R.S., Anil Joshi, Rawat P.S., Effect of pH and temperature on in vitro preservability of rabbit semen, *Indian J. Animal Sci.* 62 (1992) 144–146.
- [7] Perrier G., Thau-Clément M., Poujardieu B., Delhomme G., Essai de conservation de la semence de lapin pendant 72 h, 7^{es} Journées de la recherche Cunicole en France, Lyon 13–14 mai 1998, pp. 237–240.
- [8] Pizzi F., Guaita N., Luzi F., Biffi B., Brivio R., Crimella C., Effect of the number of spermatozoa and spermatozoal quality on fertility in rabbits. 6th World Rabbit Congress, Toulouse, 9–12 juillet 1996, Vol. 2, pp. 111–114.
- [9] Santa Maria A., Gutierrez E., López Martín J., Refrigeración (5 °C por 24 horas), efecto de aditivos y fertilidad de semen de conejo angora. *Agro-Ciencia* 5 (1989) 43–48.
- [10] SAS. Statistical Analysis System, SAS Institute, Inc, Cary, NC, USA, copyright, 1989.
- [11] Viudes De Castro M.P., Vicente J.S., Effect of semen count on the fertility and prolificity rates of meat rabbits. *Anim. Reprod. Sci.* 46 (1997) 313–319.
- [12] Viudes De Castro M.P., Vicente J.S., Lavara R., Incremento de la eficacia de utilización de los machos para inseminación en una explotación cunícola, VII Jornadas sobre Producción Animal, Zaragoza 20–22 mai 1997, ITEA 18, pp. 463–465.
- [13] Viudes De Castro M.P., Vicente J.S., Lavara R., Lavara F., Efficacité de l'insemination artificielle avec un faible nombre de spermatozoïdes dans des élevages commerciaux, 7^{es} Journées de la recherche Cunicole en France, Lyon 13–14 mai 1998, pp. 241–243.