

19ème Journée d'Etude



3 Mars 1993

**LA SEMENCE CONGEELEE D'ETALON :
DONNEES EXPERIMENTALES ET DE TERRAIN**

Par Marianne VIDAMENT,
Michèle MAGISTRINI*,
Isabelle COUTY* et E. PALMER*
Institut du Cheval
*INRA Nouzilly
37380 MONNAIE

Résumé

L'utilisation des trois premiers jets de l'éjaculat n'a pas amélioré la congélabilité : à la décongélation, le pourcentage de spermatozoïdes mobiles de 24 éjaculats a été le même pour la 1ère fraction (25 ± 1) et pour le sperme reconstitué (25 ± 1).

Sur 10 techniques (température x temps) de décongélation utilisées sur 6 éjaculats (37°C-30s (témoin), 50°C-10s, 50°C-15s, 50°C-20s, 60°C-10s, 60°C-15s, 60°C-20s, 75°C-10s, 75°C-10s, 75°C-15s) : 75°C-15s a tué les spermatozoïdes et 75°C-10s a amélioré le pourcentage de spermatozoïdes mobiles 2 h après décongélation (18 % vs témoin : 14% (P<0,05)).

L'analyse combinée des facteurs femelle et des facteurs mâle sur la fertilité par cycle des doses mises en place sur le terrain a montré un effet prépondérant de la femelle. Le taux d'ovulation (1 ovulation : 29,7% (n=562), 2 ovulations : 44,6% (n=83)), la répétition des inséminations (1IA : 24 à 29% (suivant la dose et le rythme utilisé) (n=254), >1IA : 35 à 38% (n=481)), l'insémination des juments suitées à la seconde chaleur (1ère chaleur : 29,6% (n=223), 2ème chaleur : 42% (n=150)) sont des facteurs bien plus efficaces qu'une sélection augmentée des éjaculats par l'un quelconque des critères mesurables de la motilité par un analyseur.

MOTS-CLES : ETALON, SPERMATOZOIDE, CONGELATION, DECONGELATION, FERTILITE

Summary

Use of sperm rich fraction of ejaculate did not improve freezability : percentage of motile sperm of 24 ejaculates was the same for sperm rich fraction (25 ± 1) and for whole sperm (25 ± 1).

When using 10 thawing procedure (temperature x time) with 6 ejaculates (37°C-30s (control), 50°C-10s, 50°C-15s, 50°C-20s, 60°C-10s, 60°C-15s, 60°C-20s, 75°C-5s, 75°C10s, 75°C-15s) : 75°C-15s killed all spermatozoa and 75°C-10s improved percentage of motile sperm 2 hours after thawing (18% vs control : 14% (P<0,05)).

The simultaneous study of male and female factors on the fertility per cycle of frozen semen used in field have shown major effects of the female factors. Ovulation rate (1 ovulation : 29,7% (n=562), 2 ovulations : 44,6% (n=83)), repetition of inseminations (1AI : 24 à 29% (n=254), > 1AI : 35 à 38% (n=481)), using second heat of foaling mares (cycle 1 : 29,6% (n=223), cycle 2 : 42% (n=150)) are much more efficient ways to improve fertility than an increase in selection of ejaculates with motility parameters of an automated analyser.

KEY-WORDS : STALLION, SPERMATOZOA, FREEZING, THAWING, FERTILITY

INTRODUCTION

La fertilité obtenue après insémination des juments par du sperme congelé, de l'ordre de 30 à 35% par cycle, est encore modeste.

Les étapes de la technique INRA sont les suivantes :

1 - **La technique de congélation** décrite par PALMER 1984 comporte : récolte, dilution, refroidissement de la semence de 35 à 4°C, addition de glycérol, congélation, contrôle des doses après décongélation.

2 - **La décongélation des paillettes** se fait en plongeant celles-ci dans un bain-marie à 37°C pendant 30 secondes. Pour les inséminations, le contenu des paillettes est vidé dans un tube, puis inséminé directement. Pour le contrôle des éjaculats, le contenu d'une paillette est dilué au 1/5 et incubé 10 minutes à 37°C.

3 - **La mesure de la mobilité des spermatozoïdes par un appareil de mesure de la mobilité automatisée** (HTM 2000, Hamilton Research, Massachussets, USA) se fait en routine au laboratoire étalon de l'INRA de Nouzilly. Les variables suivantes ont été retenues comme décrivant la mobilité (PALMER 1991) :

RAP : % de spermatozoïdes mobiles de plus de 30 μ /s,
 LIN : % de linéarité du déplacement des spermatozoïdes,
 ALH : amplitude des oscillations de la tête (μ m),
 VCL : vitesse instantanée (μ m/s),
 MOT : % de spermatozoïdes mobiles.

4 - **La sélection des éjaculats de bonne qualité** se fait en notant la mobilité de 3 paillettes décongelées par éjaculat, et de 2 gouttes par paillette. Les études de comparaison entre la notation de mobilité faite au microscope par un expert INRA (% de spermatozoïdes mobiles progressifs) et par l'HTM ont montré que cet appareil, après réglages précis en fonction de l'espèce, du type de sperme, du dilueur et de la concentration des échantillons, pouvait remplacer la note INRA par le % de spermatozoïdes mobiles de plus de 30 μ /s (RAP) (BATAILLE et al 90, PALMER 1991). L'HTM remplace donc l'expert INRA depuis 90 pour la sélection des éjaculats des Haras Nationaux : ceux-ci sont sélectionnés si la moyenne "RAP" est supérieure ou égale à 35%.

5 - **La mise en place des doses congelées.** Avant insémination, les juments doivent être en chaleur et présenter au moins un follicule de 35mm à l'échographie. A partir de son apparition et jusqu'à son ovulation, les juments sont examinées tous les jours pour constater l'ovulation et inséminées soit tous les jours par 200x10⁶ spermatozoïdes (4 paillettes), soit tous les 2 jours par 400x10⁶ spermatozoïdes (8 paillettes), tant que l'ovulation n'a pas eu lieu. A partir de 1991, il a été recommandé de substituer le rythme 200x 10⁶ spermatozoïdes par 24h par une dose de 400x10⁶, suivie tous les jours par des doses à 200x10⁶.

Des études précises de chaque étape doivent contribuer à améliorer les résultats. Ici seront décrites deux études expérimentales concernant :

- l'étape de récolte-congélation : congélation des premiers jets de la semence,
- l'étape de décongélation : essai de différentes températures supérieures à 37°C.

Puis sera exposée une étude de terrain où la fertilité en insémination de sperme congelé a été analysée en fonction des caractéristiques des éjaculats mis en place dans les Haras Nationaux et en fonction des caractéristiques propres des juments concernées.

B - RESULTATS

1 - Caractéristiques comparées des 2 types de sperme

Le tableau 2 montre les valeurs de volume et de concentration. On vérifie bien que pour un volume représentant la moitié du volume du sperme reconstitué total, le sperme de la 1^{ère} fraction a une concentration pratiquement double de celle du sperme reconstitué, comme cela avait été décrit par TISCHNER et al (1974).

2 - Mobilités comparées des 2 types de sperme au cours des étapes de la congélation

Aux 3 moments d'observation (dilution, après équilibration avec le glycérol, après congélation-décongélation), il n'y a aucune différence pour les caractéristiques de mobilité (ALH, VCL, RAP) entre les 2 types de sperme, alors que la semence perd graduellement de la qualité (tableau 2).

C - DISCUSSION

Le procédé utilisé ici a-t-il fabriqué un sperme reconstitué proche du sperme entier que l'on aurait obtenu ? Les 2 fractions pures étaient séparées assez longtemps avant reconstitution : environ 8 minutes (temps des mesures et des calculs). Le sperme reconstitué restait pur environ 5 minutes, ce qui correspond au temps habituel de dilution lors d'une congélation de routine.

Malgré une composition différente de chaque type de sperme : en concentration en spermatozoïdes, en taux de plasma séminal, la congélabilité de chaque type de sperme a été très semblable à l'intérieur du même éjaculat comme si, au moment de la préparation des 2 types de sperme, tout était déjà décidé. Les facteurs intervenant avant cette étape et communs aux deux types de sperme sont : qualité intrinsèque des spermatozoïdes émis, conditions d'émission de la semence au niveau de l'étalon, conditions de collecte au niveau du matériel et des manipulations.

Les étalons utilisés n'étaient pas les sujets idéaux puisque leur semence était assez concentrée. Mais sur l'étalon le moins concentré (B), on ne décèle aucune tendance à l'amélioration de la qualité sur la première fraction.

Pour achever de répondre définitivement à la question de l'intérêt de l'utilisation de cette fraction de semence, on pourrait envisager d'utiliser des étalons très peu concentrés (en saison) et de congeler également la 2^{ème} fraction.

II - DECONGELATION : ESSAI DE DIFFERENTES TEMPERATURES DE DECONGELATION.

Une cellule qui a survécu au refroidissement intense que représente la congélation, doit pouvoir survivre également à l'épreuve de la décongélation. La courbe de remontée en température lors de décongélation est sans doute aussi importante que celle de congélation (MAZUR 1985). La technique optimale de décongélation dépend de nombreux facteurs dont la vitesse de congélation, la nature et le volume du contenant, le dilueur utilisé (AMANN et PICKETT 1987). En général, si la descente de température a été rapide, la remontée de température doit l'être aussi. Suivant les conditionnements de la semence d'étalon (pellets, tubes d'aluminium, paille de 0,5, 1 ou 4 ml), les recommandations de décongélation varient en température (37 à 50°C) et en temps (30 à 50 secondes). La technique de décongélation habituellement recommandée pour les paillettes de 0,5 ml (conditionnement utilisé en France) est un passage à 37°C pendant 30 s (AMANN et PICKETT 1987).

Avec la technique américaine de congélation dans des paillettes de 0,5 ml, COCHRAN et al 1984 :

- montrent qu'à 75°C, il faut 7 s dans des paillettes en PVC et 10 s dans des paillettes en polyéthylène pour passer de la température de congélation (-196°C) à 32°C,

I - CONGELATION : ESSAI DE CONGELATION DE LA PREMIERE FRACTION DE L'EJACULAT

Lors de l'éjaculation, l'étalon émet en moyenne 8 jets (5 à 10) en 10 secondes. Les trois premiers jets, émis sous haute pression, en 3 secondes, contiennent 80% des spermatozoïdes (1er jet : 40%, 2e jet : 25%, 3e jet : 15%) et représentent la moitié du volume de l'éjaculat. Les jets suivants contiennent essentiellement du plasma séminal (TISCHNER et al 1974). Lors de la conservation de la semence d'étalon, il a été montré l'effet nocif d'une forte concentration en spermatozoïdes et l'effet nocif du plasma séminal (PALMER 1984). Lors de la congélation, il y a de plus nécessité de réaliser des doses de semence à concentration constante pour que chaque dose contienne le même nombre de spermatozoïdes. Par conséquent, toutes les techniques de congélation comportent :

1) une (ou des) étape(s) de dilution,

2) une étape permettant de séparer les spermatozoïdes du plasma séminal : par centrifugation dans les techniques française, allemande et américaine (PALMER 1984, MARTIN et al 1979, LOOMIS et al 1983) ou par l'utilisation de la 1ère fraction de l'éjaculat (2 à 4 premiers jets) dans la technique polonaise (TISCHNER 1979).

Le sperme congelé suivant cette dernière technique a été utilisé à grande échelle en Tchécoslovaquie avec des résultats tout à fait intéressants (41% de fertilité par cycle, n=1303) (MULLER 87).

Ces bons résultats peuvent-ils être expliqués par les qualités particulières de cette fraction de semence ?

A - MATERIEL ET METHODES

Sélection des éjaculats

Deux étalons récoltables à vagin ouvert ont été collectés en prélevant séparément la première fraction (3 premiers jets) et la deuxième fraction (fin de l'éjaculat). Douze éjaculats par étalon ont été retenus pour lesquels les conditions de récolte étaient satisfaisantes (bonne séparation entre 1ère et 2ème fraction, totalité des fractions).

Traitement de la semence

La moitié du volume de la 1ère fraction est mélangée à la moitié du volume de la 2ème fraction permettant de fabriquer du sperme de composition égale à celle du sperme qui aurait été émis par une technique de récolte normale. Les 2 lots de sperme (1ère fraction et reconstitué) sont ensuite dilués, centrifugés, congelés, mis en paillettes de manière identique.

(1ère dilution en tube de 10 ml à $50 \cdot 10^6$ spermatozoïdes par ml avec un maximum de 1/3 de sperme par rapport au volume total, équilibration avec dilueur glycérolé de 1 h avant mise en paillette, congélation au-dessus des vapeurs d'azote).

Mesures réalisées

- observation au microscope du pourcentage de spermatozoïdes mobiles après fabrication et dilution des 2 types de sperme,

- examen de la mobilité à l'analyseur HTM après 1 h dans le dilueur glycérolé, juste avant la mise en paillette (après dilution au 1/5 dans le dilueur glycérolé et réchauffement au bain-marie 10 minutes à 37°C),

- examen de la mobilité à l'analyseur HTM après décongélation de 5 paillettes par type de sperme et par éjaculat.

19ème Journée d'Etude



3 Mars 1993

Analyse de la structure génétique de la race Boulonnaise et programme mis en place pour préserver sa variabilité

X. TELLIER*, Frédérique LEFAUDEUX*, Anne TAVERNIER**, E. VERRIER*,
R. STIEVENARD***, B. POURCHET****

*INA Paris-Grignon, Département des Sciences animales, 16 rue Claude Bernard, F - 75231
PARIS CEDEX 05

**INRA, Station de Génétique Quantitative et Appliquée, F - 78352 JOUY-EN-JOSAS CEDEX

***Espace Naturel Régional Nord-Pas-de-Calais, Ferme du héron, F - 59650 VILLENEUVE
D'ASCQ

****Haras Nationaux, F - 60321 COMPIEGNE CEDEX

Résumé

La race Boulonnaise est une des races de chevaux de Trait les plus menacées dans leur effectif. L'analyse génétique de la race a été effectuée sur la base du fichier SIRE Boulonnais, complété et corrigé pour la circonstance, et comprenant 2 806 animaux nés de 1905 à 1991. La distribution du nombre de descendants par étalon est très hétérogène : sur les 247 étalons reproducteurs, 113 n'ont qu'un ou deux descendants connus et un étalon en a 143. Le coefficient de consanguinité moyen des animaux a régulièrement augmenté depuis 1950, pour atteindre une valeur de 5 % chez les 550 animaux nés en 1990 et 1991. On observe à peine 1 % de coefficients de parenté non nuls entre les 55 étalons actifs en 1989 ou en 1990. La parenté moyenne entre ces étalons est de 6,28 %. Sur la base de ces coefficients de parenté, 5 familles d'étalons ont été constituées. Les juments ont été rattachées à ces familles, et un plan d'accouplement entre familles, visant à minimiser l'élévation de la consanguinité, a été proposé aux éleveurs. Un choix plus diversifié et une utilisation plus équilibrée des étalons sont les premières mesures à adopter en vue de préserver au mieux la variabilité génétique de la race.

MOTS CLEFS : RACE A FAIBLE EFFECTIF ; CONSANGUINITE ; PARENTE ; GESTION GENETIQUE.

Summary

Genetic structure of the Horse breed Boulonnaise and management programme for preserving its variability.

The breed Boulonnaise is one of the most endangered french Horse breeds. A genetic analysis was realized on the basis of the data file of the breed, which was completed and corrected in this prospect, and which included 2 806 animals born from 1905 to 1991. The distribution of family sizes was very unbalanced : 113 stallions out of the 247 having a progeny had only one or two offspring, whereas one stallion had 143 offspring. The average coefficient of inbreeding regularly increased from 1950 onwards. The average value for the 550 animals born in 1990 or 1991 was 5 %. Only 1% of the kinship coefficients between the 55 stallions active in 1989 or 1990 were different from zero. The average value is 6,28 %. 5 groups of stallions were constituted on the basis of their kinship coefficients. Each mare was linked to one of these groups, and a circular mating system was proposed to breeders, in order to limit the increase in inbreeding. A choice of the young stallions more varied and an utilization of stallions more balanced are the first procedures to apply for preserving the genetic variability of the breed at best.

KEY-WORDS : RARE BREED ; INBREEDING ; RELATIONSHIP ; GENETIC MANAGEMENT.

1 IA : 25% n=192 vs > 1IA : 30% n=463 (intervalle entre la dernière insémination et l'ovulation est de moins de 24 h).

Le tableau 7 confirme les mauvaises performances d'une seule dose de 200.10⁶ par rapport à une dose de 400.10⁶ et montre qu'à partir de 2 inséminations sur le même cycle, le type de dose juste avant l'insémination ne semble pas avoir d'importance.

BIBLIOGRAPHIE

- AMANN, R.P., PICKETT, B.W. (1987). Principles of Cryopreservation and a review of Cryopreservation of stallion spermatozoa. *J. Equine Vet Sci.*, 7(3), 145-173.
- BATAILLE, B., MAGISTRINI, M., PALMER, E. (1990). Analyse objective de la mobilité du sperme congelé-décongelé d'étalon. Essai de corrélation avec la fertilité. 16ème journée d'étude, Cereopa, Paris, 7 mars, 96-106.
- COCHRAN, J.D., AMANN, R.P., FROMAN, D.P., PICKETT, B.W. (1984). Effects of Centrifugation, Glycerol Level, Cooling to 5°C, Freezing Rate and Thawing Rate on the Post-Thaw Motility of Equine Sperm. *Theriogenology*, 22(1), 25-38.
- CRISTANELLI, M.J., SQUIRES, E.L., AMANN, R.P., PICKETT, B.W. (1984). Fertility of Stallion Semen Processed, Frozen and Thawed by a New Procedure. *Theriogenology*, 22(1), 39-45.
- LOOMIS, P.R., AMANN, R.P., SQUIRES, E. L., PICKETT, B.W. (1983). Fertility of Unfrozen and Frozen Stallion Spermatozoa extended in EDTA-Lactose-Egg Yolk and Packaged in Straws. *J. Anim. Sci.*, 56(3), 687-693.
- MARTIN, J.C., KLUG, E., GINZEL, A.R. (1979). Centrifugation of Stallion and its Storage in large volume Straws. *J. Reprod. Fert.*, suppl.27, 47-51.
- MAZUR, P. (1985). Basic Concepts in Freezing Cells. In Proc. 1st Int. Conf. Deep Freezing Boar Semen. Eds Johnson and Larsson. Uppsala, Sweden, 91-111.
- MULLER, Z. (1982). Fertility of Frozen Equine Semen. *J. Reprod. Fert.*, suppl.32, 47-51.
- MULLER, Z. (1987). Practicalities of Insemination of Mares with deep-frozen Semen. *J. Reprod. Fert.*, suppl.35, 121-125.
- O'CONNOR, M.T., AMANN, R.P., SAACKE, R.G., (1981). Comparisons of Computer Evaluations of Spermatozoal Motility with Standard Laboratory Tests and their Use for Predicting Fertility. *J. Anim. Sci.* 53 (5), 1368-1376.
- PALMER, E. (1984). Factors Affecting Stallion Semen Survival and Fertility. In Proc. 10th Int. Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination. Urbana. 377-
- PALMER, E. (1984). L'Insémination Artificielle des Juments : Bilan de Cinq Années de Recherches et d'utilisation Pratique. In : *Le Cheval, Reproduction, Sélection, Alimentation, Exploitation*. Ed : INRA, Paris, 133-147.
- PALMER, E. (1991). Analyse Automatisée de la Motilité du Sperme d'Etalon après Décongélation. *Contracept. Fertil. Sex.*, 19(10), 855-863.
- TISCHNER, M. (1979). Evaluation of Deep-Frozen Semen in Stallions. *J. Reprod. Fert.*, suppl. 27, 53-59.
- TISCHNER, M., KOSINIAK, K., BIELANSKI, W. (1974). Analysis of the Pattern of Ejaculation in Stallions. *J. Reprod. Fert.*, 41, 329-335.

le rythme d'une 1ère dose de $400 \cdot 10^6$ spermatozoïdes suivie de doses de $200 \cdot 10^6$ spermatozoïdes toutes les 24 heures a été utilisé.

B - RESULTATS -DISCUSSION

Fichier 89-90

Les facteurs femelle se sont avérés influencer beaucoup plus fortement la fertilité que les facteurs mâle, (tableaux 4-5-6). La fertilité moyenne par cycle est de 31% ; elle est particulièrement influencée par le taux d'ovulation (45% après ovulation double contre 30% après ovulation simple, tableau 4). Tout se passe comme si chaque ovocyte avait une probabilité indépendante d'être fécondé ; cependant les gestations doubles restent rares. La fertilité est différente selon que les juments sont nullipares (22%), vides (26%) ou suitées (35%) mais surtout (tableau 5), elle varie différemment au cours des cycles successifs avec une fertilité qui augmente entre la première et la seconde tentative chez les juments suitées (30% à 42%) alors qu'elle diminue chez les juments non suitées (30% à 21%). Un intervalle IA-ovulation de 24-48 heures n'a pas réduit la fertilité comparé à un intervalle de moins de 24h de même que l'induction d'ovulation par hCG n'a pas eu d'influence (31%). Contrairement à ce qui se dit, la capacité de survie in vivo du sperme après décongélation n'est pas très fortement réduite. Nous n'avons pas constaté de modification de fertilité par l'adoption des doses de 200×10^6 inséminées chaque jour plutôt que des doses de 400×10^6 inséminées toutes les 48 heures. Cependant la répétition des inséminations (tableau 6) améliore la fertilité avec des doses de 400×10^6 (29% à 35%) mais surtout avec des doses de 200×10^6 (24% à 38%). Nous ne savons pas par quel mécanisme la répétition des IA peut augmenter la fertilité.

Pour mesurer l'influence des caractéristiques du sperme nous avons de nouveau séparé les éjaculats en deux catégories pour chaque critère et avons comparé la fertilité des éjaculats au-dessus ou au-dessous de la moyenne (tableau 4).

Les mesures de motilité effectuées par la machine n'ont pas montré de facteur ayant une influence significative sur la fertilité : la plus grande différence est obtenue pour le pourcentage de spermatozoïdes rapides (>30 microns par seconde) avec une fertilité de 33,4% contre 27% ; malheureusement cette différence n'est pas significative.

O'CONNOR et al (1981) ont déjà essayé sans grand succès de corréler la fertilité des taureaux avec les caractéristiques du sperme. Leur interprétation était que cela était dû au caractère imprécis de la mesure de la fertilité. Cela est encore plus vrai chez le cheval où le nombre de juments utilisant le même éjaculat est de l'ordre de 5 à 10, alors qu'il est de 83 à 383 dans l'étude citée plus haut.

Fichier 92

Avec une moyenne de fertilité par cycle plus basse, l'analyse de ce fichier confirme les données précédentes (toutes les fertilités mentionnées ici sont des fertilités par cycle) :

- supériorité de la double ovulation par rapport à l'ovulation simple 39% n=87 vs 27% n=675,
- supériorité de la fertilité des juments suitées par rapport aux juments vides 29% n=501 vs 23% n=263,
- pour les juments suitées, supériorité du cycle n°2 par rapport au cycle n°1 37% n=156 vs 25% n=240,
- pic de fertilité en avril par rapport aux autres mois avant avril : 22% n=83, avril : 33% n=254, mai : 22% n=284, après mai : 29% n=288,
- importance du nombre d'insémination par cycle, quel que soit le type de dose utilisé :

TABEAU 4 : RESULTATS DE FERTILITE PAR CYCLE EN I.A. DE SPERME CONGELE - EFFETS RESPECTIFS DE FACTEURS FEMELLE ET DE FACTEURS MALE (fichier 89-90)

Fertility in 1989-1990 with frozen semen AI - Respective female and male effects.

CRITERE FEMELLE FERT.			n	CRITERE MALE FERT.			n
(%)				(%)			
Age (ans)	<12,3	29,8	386	Nbre despz	200x10 ⁶	30,0	343
	>12,3	31,1	380		400x10 ⁶	31,3	396
Etat	vide	26,4	159	Année de production	1988	30,1	113
	nullipare	22,2	54		1989	31,3	508
	suitée	34,6	465		1990	27,6	145
N° de cycle	1	29,4	354	Caractéristiques du sperme			
	2	33,8	234	mesurées par la machine			
	> 2	28,1	178	ALH	< 3,61	31,6	431
Mois d'IA	<4	26,7	195		> 3,61	29,0	335
	4	35,5	138	LIN	< 88,49	28,8	313
	5	32,2	199		> 88,49	31,6	453
	> 5	29,1	234		VCL	< 88,44	32,4
			> 88,44		28,6	402	
RCG	oui	30,1	479	MOT	< 56,35	27,1	354
	non	31,0	287		> 56,35	33,3	412
Nbre d'ov	1	29,7	562	RAP	< 53,18	27,0	356
	2	44,6	83		> 53,18	33,4	410
Intervalle IA-ov	< 24 h	31,4	528				
	24-48 h	29,9	97				

TABEAU 5 : EFFETS CONJUGUES DE L'ETAT PHYSIOLOGIQUE ET DU NUMERO DE CYCLE SUR LA FERTILITE PAR CYCLE DES JUMENTS INSEMINÉES PAR DU SPERME CONGELE D'ETALON (fichier 89-90)

Conjugated effects of physiological status and of cycle number (89-90 data)

		1er cycle		2eme cycle		≥ 3eme cycle	
		Fert(%)	n	Fert(%)	n	Fert(%)	n
Etat	vides	31,4%	70	23,3%	43	21,7%	46
	nullipares	25,9%	27	18,8%	16	18,2%	11
	suitées	29,6%	223	42,0%	150	34,8%	92

TABEAU 6 : FERTILITE PAR CYCLE SELON LE NOMBRE D'IA. ET LE NOMBRE DE SPERMATOZOIDES PAR I.A. CHEZ DES JUMENTS DONT LA DERNIERE I.A. EST LA VEILLE DE L'OVULATION (fichier 89-90)

Fertility according to the number of AI and the number of spermatozoa per AI in mares last inseminated less than 24 hours before ovulation (89-90 data)

	nb IA=1		nb IA>1	
	Fert (%)	n	Fert (%)	n
200x10 ⁶ toutes les 24 heures	24%	84	38%	313
400x10 ⁶ toutes les 48 heures	29%	170	35%	168

TABEAU 7 : FERTILITE PAR CYCLE SELON LE NOMBRE D'IA. ET LE NOMBRE DE SPERMATOZOIDES PAR I.A. CHEZ DES JUMENTS DONT LA DERNIERE I.A. EST LA VEILLE DE L'OVULATION (fichier 92)

Fertility according to the number of AI and the number of spermatozoa per AI in mares last inseminated less than 24 hours before ovulation (92 data)

Nb spz	nb IA=1		Nb spz	nb IA>1	
	Fert (%)	n		Fert (%)	n
200x10 ⁶	18%	34	200x10 ⁶ ttes les 24 h	31%	72
			400x10 ⁶ puis 200x10 ⁶ ttes les 24 h	29%	316
			400x10 ⁶ ttes les 48 h	30%	23

le rythme d'une 1ère dose de 400.10^6 spermatozoïdes suivie de doses de 200.10^6 spermatozoïdes toutes les 24 heures a été utilisé.

B - RESULTATS - DISCUSSION

Fichier 89-90

Les facteurs femelle se sont avérés influencer beaucoup plus fortement la fertilité que les facteurs mâle, (tableaux 4-5-6). La fertilité moyenne par cycle est de 31% ; elle est particulièrement influencée par le taux d'ovulation (45% après ovulation double contre 30% après ovulation simple, tableau 4). Tout se passe comme si chaque ovocyte avait une probabilité indépendante d'être fécondé ; cependant les gestations doubles restent rares. La fertilité est différente selon que les juments sont nullipares (22%), vides (26%) ou suitées (35%) mais surtout (tableau 5), elle varie différemment au cours des cycles successifs avec une fertilité qui augmente entre la première et la seconde tentative chez les juments suitées (30% à 42%) alors qu'elle diminue chez les juments non suitées (30% à 21%). Un intervalle IA-ovulation de 24-48 heures n'a pas réduit la fertilité comparé à un intervalle de moins de 24h de même que l'induction d'ovulation par hCG n'a pas eu d'influence (31%). Contrairement à ce qui se dit, la capacité de survie in vivo du sperme après décongélation n'est pas très fortement réduite. Nous n'avons pas constaté de modification de fertilité par l'adoption des doses de 200×10^6 inséminées chaque jour plutôt que des doses de 400×10^6 inséminées toutes les 48 heures. Cependant la répétition des inséminations (tableau 6) améliore la fertilité avec des doses de 400×10^6 (29% à 35%) mais surtout avec des doses de 200×10^6 (24% à 38%). Nous ne savons pas par quel mécanisme la répétition des IA peut augmenter la fertilité.

Pour mesurer l'influence des caractéristiques du sperme nous avons de nouveau séparé les éjaculats en deux catégories pour chaque critère et avons comparé la fertilité des éjaculats au-dessus ou au-dessous de la moyenne (tableau 4).

Les mesures de motilité effectuées par la machine n'ont pas montré de facteur ayant une influence significative sur la fertilité : la plus grande différence est obtenue pour le pourcentage de spermatozoïdes rapides (>30 microns par seconde) avec une fertilité de 33,4% contre 27% ; malheureusement cette différence n'est pas significative.

O'CONNOR et al (1981) ont déjà essayé sans grand succès de corréler la fertilité des taureaux avec les caractéristiques du sperme. Leur interprétation était que cela était dû au caractère imprécis de la mesure de la fertilité. Cela est encore plus vrai chez le cheval où le nombre de juments utilisant le même éjaculat est de l'ordre de 5 à 10, alors qu'il est de 83 à 383 dans l'étude citée plus haut.

Fichier 92

Avec une moyenne de fertilité par cycle plus basse, l'analyse de ce fichier confirme les données précédentes (toutes les fertilités mentionnées ici sont des fertilités par cycle) :

- supériorité de la double ovulation par rapport à l'ovulation simple 39% n=87 vs 27% n=675,
- supériorité de la fertilité des juments suitées par rapport aux juments vides 29% n=501 vs 23% n=263,
- pour les juments suitées, supériorité du cycle n°2 par rapport au cycle n°1 37% n=156 vs 25% n=240,
- pic de fertilité en avril par rapport aux autres mois avant avril : 22% n=83, avril : 33% n=254, mai : 22% n=284, après mai : 29% n=288,
- importance du nombre d'insémination par cycle, quel que soit le type de dose utilisé :

C - DISCUSSION

MAZUR 1985 pense que des vitesses de décongélation très rapides sur des cellules congelées très rapidement (cas des spermatozoïdes équin) peuvent "sauver" au moins une partie des cellules qui, autrement, auraient été abîmées par la reformation de gros cristaux pendant la décongélation. AMANN et PICKETT 87 évaluent à 700°C/mn et à 2000-4000°C/mn les vitesses de décongélation respectives d'une paillette de 0,5 ml plongée dans un bain-marie à 37°C et à 75°C, donc une vitesse beaucoup plus rapide pour la 2ème technique. CRISTANELLI et al obtiennent une fertilité par cycle très correcte (56%, n=54) en décongelant des paillettes de polypropylène de 0,5 ml à 75°C pendant 10 s mais avec le sperme de 3 étalons seulement et sans comparaison avec une technique de décongélation classique.

Ici, seule la technique 75°C- 10 s a amélioré le RAP par rapport à la technique témoin 120 minutes après décongélation. Par contre, cette technique est la plus proche de celle (75°C - 15 s) qui a entraîné la mort de tous les spermatozoïdes. Dans l'expérimentation préliminaire, la technique 75°C - 11 s avait préservé les spermatozoïdes.

A la suite de ces résultats, il faut donc envisager de continuer dans la voie des décongelations à 75°C et :

- de confirmer ces résultats sur un plus grand nombre d'éjaculats,
- de faire une gamme de temps plus serrée autour des 10 s pour déceler le temps minimal qui améliore la mobilité des spermatozoïdes et le temps minimal qui les détruit, pour décider s'il s'agit d'une technique applicable sur le terrain,
- d'éventuellement analyser l'intégrité des membranes suite à ce type de décongélation, - enfin de tester la fertilité des spermatozoïdes décongelés de cette façon.

III - MISE EN PLACE DES DOSES CONGELEES SUR LE TERRAIN : INFLUENCE RESPECTIVE SUR LA FERTILITE DES FACTEURS FEMELLE ET DES FACTEURS MALE ANALYSES

Sur 60 éjaculats d'étalons Haras Nationaux congelés en 87-88-89 sélectionnés par l'expert INRA et utilisés sur 554 cycles de juments, BATAILLE et al 1990 avaient essayé, sans succès, de trouver des relations entre les caractéristiques du sperme mesurées par l'HTM (ALH, LIN, VCL, RAP) ou par la note INRA et la fertilité.

Les résultats de l'analyse précédente ayant été décevants, il a semblé intéressant de recommencer l'analyse sur un autre fichier.

A - MATERIEL ET METHODES

Fichier 89-90

Il s'agit d'un fichier de 766 cycles de juments inséminées en 1989 et 1990 en y incluant l'étude des facteurs liés à la femelle comme ceux des mesures faites sur le sperme utilisé, provenant des productions de 1988, 1989 et 1990. Le maximum de renseignements a été collecté sur l'âge, l'état physiologique, le numéro du cycle utilisé, le mois d'IA, l'induction d'ovulation, le nombre d'ovulations, et l'intervalle entre la dernière IA et l'ovulation. Ils ont été mis en relation avec les résultats de fertilité.

Fichier 92

Il s'agit d'un fichier de 1041 cycles de juments inséminées en 1992 par des doses congelées d'étalons des Haras Nationaux et ne comportant que les caractéristiques femelles citées plus haut ainsi que le type et le rythme d'utilisation des doses de semence. Par rapport au fichier précédent,

- obtiennent un % de spermatozoïdes mobiles supérieur de 4 points lors de décongélation à 75°C pendant 7 secondes par rapport à une décongélation à 37°C pendant 30 secondes pour du sperme conditionné en paillette en PVC.

Dans la technique INRA, la décongélation à température beaucoup plus élevée pourrait-elle améliorer la qualité de la semence de qualité tout juste inférieure au seuil d'acceptabilité ?

A - MATERIEL ET METHODES

Etudes préliminaires

- En insérant des thermo-couples dans des paillettes PVC 0,5 ml contenant du milieu de congélation et plongées dans l'azote liquide puis dans différentes températures de bain-marie : 37°C, 50°C, 60°C, 75°C, il a été mesuré le passage à 0°C respectivement à 7, 6, 7 et 5 s et le passage à 35°C respectivement à 35, 17, 14 et 11 s sans correction par rapport à l'inertie de réponse de la sonde et du thermomètre.

- Dans une étude suivante, les techniques de décongélation de la semence en paillettes PVC de 0,5 ml à 50°C pendant 18 s, à 60°C pendant 15 s et à 75°C pendant 11 s, n'ont pas semblé altérer la semence par rapport à la technique témoin à 37°C pendant 30 s.

Technique de décongélation

Sur 6 éjaculats congelés par la technique INRA (PALMER 1984) et de mauvaise qualité (RAP > 35%), conditionnés dans des paillettes de 0,5 ml en PVC, il a été testé 10 techniques différentes de décongélation sur 3 paillettes par éjaculat (sauf pour la technique témoin : 9 paillettes), en jouant sur la température et le temps :

37°C : 30 s (technique témoin)
 50°C : 10 s, 15 s, 20 s
 60°C : 10 s, 15 s, 20 s
 75°C : 5 s, 10 s, 15 s

Pour les températures au-dessus de 37°C, les paillettes étaient ensuite rapidement plongées dans le bain-marie à 37°C, pendant un temps tel que le temps total de décongélation était de 30 s.

Mesures réalisées

Examen de la mobilité à l'analyseur HTM 10 minutes et 2 heures après décongélation.

B - RESULTATS

1 - Mobilité 10 minutes après décongélation (tableau 3)

La technique de décongélation à 75°C pendant 15 s tue tous les spermatozoïdes. Par contre, il n'y a aucune différence entre les autres techniques testées et la technique témoin pour les critères : LIN, VCL, RAP.

2 - Mobilité 120 minutes après décongélation (tableau 3)

On constate à nouveau que la technique de décongélation à 75°C pendant 15 s a tué tous les spermatozoïdes. Seule la technique à 75°C pendant 10 s améliore significativement le RAP par rapport à la technique témoin (18% vs 14% (P < 0,05)).

Les autres critères de mobilité (LIN et VCL) ne sont pas affectés sauf dans le lot 75°C-15 s.

TABEAU 1 : CARACTERISTIQUES COMPAREES DE LA 1ERE FRACTION ET DU SPERME RECONSTITUE (moyenne \pm sd, n=12 par case)

Compared characteristics of first part and whole sperm (mean \pm sd, n=12 by square)

		1ère fraction first part	Reconstitué whole sperm
Eталon A	Volume (ml)	12 \pm 7	24 \pm 10
	Concentration (10 ⁶ /ml)	390 \pm 220	236 \pm 120
Eталon B	Volume (ml)	11 \pm 3	27 \pm 13
	Concentration (10 ⁶ /ml)	202 \pm 64	110 \pm 30

TABEAU 2 : MOBILITES COMPAREES DE LA 1ERE FRACTION ET DU SPERME RECONSTITUE AU COURS DES ETAPES DE LA CONGELATION (moyenne \pm s.e.m, n=12 par case)

Compared motilities of first part and whole sperm after steps of the freezing procedure (mean \pm s.e.m n=12 by square)

	Dilution (% spz mobiles au microscope)		Après addition de glycérol (% spz rapides (RAP))		Congélation- décongélation (% spz rapides (RAP))	
	1ère fraction	Reconstitué	1ère fraction	Reconstitué	1ère fraction	Reconstitué
Eталon A	68 \pm 0,01	65 \pm 0,01	39 \pm 2	34 \pm 2	21 \pm 1	22 \pm 1
Eталon B	75 \pm 0,01	73 \pm 0,01	51 \pm 2	49 \pm 2	29 \pm 1	29 \pm 1
Total	72 \pm 0,01	69 \pm 0,01	45 \pm 1	41 \pm 1	25 \pm 1	25 \pm 1
	NS		NS		NS	

NS pas de différence significative entre les 2 types de sperme

TABEAU 3 : MOBILITES COMPAREES (RAP) ENTRE LES DIFFERENTES TECHNIQUES DE DECONGELATION MESUREES 10 ET 120 MINUTES APRES DECONGELATION (moyenne \pm s.e.m, n=6 par case)

Compared motilities (RAP) between different thawing procedures measured at 10 and 120 minutes post-thawing (mean \pm s.e.m, n=6 by square)

Technique de décongélation	Mesure 10 minutes après décongélation	Mesure 120 minutes après décongélation
Témoin 37°C - 30 s	21,2 \pm 0,6	13,9 \pm 0,5
50°C - 10 s	21,7 \pm 0,6	15,2 \pm 0,5
50°C - 15 s	22,4 \pm 0,6	14,5 \pm 0,5
50°C - 10 s	23,3 \pm 0,6	14 \pm 0,5
60°C - 5 s	21 \pm 0,6	16,4 \pm 0,5
60°C - 10 s	21,6 \pm 0,6	15,7 \pm 0,5
60°C - 15 s	21,3 \pm 0,6	14 \pm 0,5
75°C - 5 s	22,6 \pm 0,6	15 \pm 0,5
75°C - 10 s	23,8 \pm 0,6	17,9 \pm 0,5 *
75°C - 15 s	0,4 \pm 0,6 *	0,5 \pm 0,5 *

* différence significative avec le témoin (P<0,05)