

22ème journée d'étude



28 février 1996

La fraction riche : une nouvelle solution pour maîtriser la congélabilité de la semence du baudet du Poitou

A. Trimeche et D. Tainturier
Service de pathologie de la reproduction
Ecole nationale vétérinaire de Nantes
Case Postale 3013, 44087 Nantes Cedex 03.

Résumé

La récolte de trois premiers jets de l'éjaculat du Baudet du Poitou (fraction 1) et le reste de l'éjaculat (fraction 2) montre un volume significativement inférieur pour la première fraction par rapport à la deuxième. Les spermatozoïdes sont plus concentrés dans la fraction 1 que l'on peut appeler fraction riche. L'étude de la congélation-décongélation de 24 éjaculats provenant de 4 Baudets du Poitou à l'aide d'un analyseur d'images ATS 40 montre une amélioration significative de la mobilité, la VCL et l'ALH pour la fraction riche par rapport à l'éjaculat reconstitué (1/2 volume fraction 1 + 1/2 volume fraction 2).

Mots clés : Baudet du Poitou, sperme, fraction riche, congélation-décongélation, analyseur d'images ATS 40.

Summary

The first three castings of the Poitou jackass ejaculate (fraction 1) and of the rest of the ejaculate (fraction 2) were collected. The volume of fraction 1 was significantly lower than that of fraction 2, and the sperm concentration in fraction 1 was much higher, showing the presence of a sperm-rich fraction. The ability to freeze and thaw of the sperm rich fraction and the whole sperm was studied in 24 ejaculates from 4 individuals, using an ATS 40 computer system analysis. The sperm rich fraction showed a significantly higher mobility, VCL and ALH than the whole sperm.

Key-words : Poitou jackass, sperm-rich fraction, freezing-thawing, ATS 40 Computer system Analysis.

I - INTRODUCTION

La technique de congélation de la semence du Baudet du Poitou mise au point par l'équipe du Service de pathologie de la reproduction, basée sur la sélection des éjaculats totaux à concentration élevée en spermatozoïdes et évitant la centrifugation, a permis d'obtenir les premières gestations de Baudettes du Poitou avec 3 à 6 inséminations utilisant 20 paillettes à 60 millions par ml de spermatozoïdes. Dans l'objectif d'améliorer cette technique et d'économiser le nombre de paillettes utilisées par insémination artificielle, nous avons cherché à savoir s'il existait une fraction riche en spermatozoïdes dans l'éjaculat du Baudet du Poitou et son aptitude à la congélation. En effet, chez l'étalon 5 à 10 jets sont observés lors de l'éjaculation, soit une moyenne de 8 jets. Les trois premiers jets contiennent 80% des spermatozoïdes éjaculés (Tischner et al., 1974).

II - MATERIEL ET METHODES

A - Congélation et analyse du sperme

Trente deux éjaculats provenant de 4 baudets du Poitou âgés de 4, 6, 7 et 10 ans sont prélevés tous les 2 jours au cours de la période d'avril à juin, à l'aide d'un vagin ouvert type INRA (IMV, l'Aigle, France). Les trois premiers jets constituent la fraction 1, sont récupérés ensemble, le reste de l'éjaculat (fraction 2) est récupéré dans un autre tube. Ensuite, l'éjaculat total est reconstitué par le mélange de la moitié de la fraction 1 et de la moitié de la fraction 2 ce qui constitue la fraction reconstituée (éjaculat total).

Nous avons déterminé le volume de la fraction 1, la fraction 2, leurs concentrations à l'aide d'un spectrophotomètre réglé à 550 nm, le nombre total des spermatozoïdes dans chaque fraction. Le procédé de congélation de la fraction 1 ou de l'éjaculat reconstitué consiste à filtrer et à diluer le sperme immédiatement après éjaculation à 34°C dans le milieu T2-94 (Trimeche et al., 1995 ; Trimeche, 1996) pour obtenir une concentration finale de 100 millions de spermatozoïdes/ml pour la fraction 1 et de 60 millions de spermatozoïdes/ml pour l'éjaculat reconstitué.

Après dilution, le sperme est refroidi de 34°C à + 4°C selon une pente de -0,5°C min⁻¹ à l'aide d'une machine programmable (Huber PD 410, Offenburg-Elgersweier, Allemagne). Ensuite, la semence est conditionnée en paillettes de 0,5 ml (I.M.V, l'Aigle, France) congelées dans les vapeurs d'azote pendant 10 minutes puis immergées dans l'azote liquide (-196°C). L'étude de la congélation de la fraction 1 et de l'éjaculat reconstitué est réalisée à l'aide d'un analyseur d'images ATS 40.

Le réglage de l'analyseur et les paramètres d'observation sont identiques à ceux décrits dans les expériences précédentes. Nous avons étudié pour chaque fraction la mobilité, les caractéristiques de mouvements (VCL, VSL, LIN, VAP, ALH), le pourcentage des spermatozoïdes progressifs ondulants et le pourcentage des spermatozoïdes à vitesses irrégulières.

B - Analyse statistique

Les résultats sont exprimés par des moyennes \pm SD. L'analyse statistique est réalisée à l'aide de test de Student (séries appariées) sur le logiciel Statview IV (Abacus Concepts, USA). Le seuil de signification retenu est de 1%.

III - RESULTATS

A - Paramètres du sperme frais

1- Le volume

Le volume de la fraction 1 (12,5 \pm 8,5 ml) est significativement inférieur à celui de la fraction 2 (30,6 \pm 15,6 ml) (P<0,01).

2 - La concentration

La concentration en spermatozoïdes de la fraction 1 et de la fraction 2, déterminée à l'aide d'un spectrophotomètre réglé à 550 nm est significativement différente. En effet, la concentration en spermatozoïdes par ml de la fraction 1 ($408,5 \pm 110,5 \cdot 10^6$ spermatozoïdes/ml) est significativement supérieure à celle de la fraction 2 ($120,5 \pm 52,6 \cdot 10^6$ spermatozoïdes/ml) ($P < 0,01$). La concentration et le volume observés prouvent l'existence d'une fraction riche en spermatozoïdes dans l'éjaculat du Baudet du Poitou.

B - Examen de la congélabilité de la fraction 1 et de la fraction reconstituée de l'éjaculat du Baudet du Poitou

Comme le montre le tableau 1, la mobilité, la VCL et l'ALH sont significativement plus élevées pour la fraction 1 par rapport à la fraction reconstituée après congélation-décongélation ($P < 0,01$). Cependant, les autres paramètres (VSL, VAP, LIN), le pourcentage des spermatozoïdes progressifs ondulants et le pourcentage des spermatozoïdes à vitesses irrégulières ne sont pas significativement différents ($P > 0,01$). Ceci montre que la première fraction de l'éjaculat du baudet du Poitou se congèle mieux que l'éjaculat total.

Tableau 1 : variation des caractéristiques de mouvement et du pourcentage des spermatozoïdes progressifs ondulants et ceux à vitesses irrégulières en fonction du type de fraction.

	fraction 1	fraction reconstituée
Mobilité (%)	$61,3 \pm 15,3$	$44,3 \pm 20,4^*$
VCL ($\mu\text{m/s}$)	$68,1 \pm 6,9$	$64,3 \pm 9,9^*$
VSL ($\mu\text{m/s}$)	$58,0 \pm 8,2$	$55,1 \pm 10,9$
VAP ($\mu\text{m/s}$)	$60,2 \pm 8,3$	$56,5 \pm 11,0$
LIN (%)	$80,0 \pm 4,2$	$80,5 \pm 4,5$
ALH (μm)	$2,2 \pm 0,4$	$2,0 \pm 0,2^*$
Progressifs ondulants (%)	$67,8 \pm 8,0$	$68,5 \pm 9,1$
Vitesses irrégulières (%)	$21,6 \pm 6,9$	$21,0 \pm 6,9$

* la Mobilité, la VCL et l'ALH sont significativement différentes entre les deux fractions ($p < 0,01$).

n = 32 éjaculats (8 éjaculats x 4 individus).

IV - DISCUSSION

Les résultats de la concentration en spermatozoïdes de la fraction 1 montrent l'existence d'une fraction riche dans l'éjaculat du Baudet du Poitou. Cette fraction correspond aux trois premiers jets émis lors de l'éjaculation comme cela a été démontré chez le cheval (Tischner *et al.*, 1974 ; Tischner, 1979 ; Tischner et Kosiniak, 1992 ; Vidament *et al.*, 1993). Cependant, le volume obtenu pour cette fraction est très variable, il varie de 6 à 25 ml.

En plus de la variabilité *intra* et *inter* individu, cette différence trouve son origine dans la mauvaise maîtrise de la technique d'une part et de la difficulté de prélèvement à l'aide du vagin ouvert d'autre part. En effet, cette technique demande une parfaite technicité et une équipe bien rodée. Contrairement à ce qui a été observé chez l'étalon par Vidament *et al.* (1993), la congélation de la fraction riche de la semence du Baudet du Poitou améliore significativement la mobilité, la VCL et l'ALH des spermatozoïdes après congélation-décongélation. En plus de cet effet bénéfique, la concentration des spermatozoïdes congelés avec la fraction riche est plus élevée ($100 \cdot 10^6$ spermatozoïdes/ml), ce qui nous fait économiser 8 paillettes pour chaque insémination.

V - CONCLUSION

Cette étude prouve que, comme chez l'étalon, les trois premiers jets de l'éjaculat constituent une fraction riche en spermatozoïdes. En plus, chez le Baudet du Poitou, cette fraction améliore nettement la congélabilité de la semence et économise le nombre des paillettes utilisées pour les inséminations.

VI - REMERCIEMENTS

Ces travaux sont financés en partie par l'Association du sauvegarde du Baudet du Poitou (SABAUD) et le Parc naturel régional du Marais Poitevin. Nous remercions le professeur J.L. Auget pour son aide au traitement statistique, Melle Angibaud Virginie et Monsieur Chatagnon G. pour leur assistance technique.

VII - REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Tischner M., Kosiniak K. and Bielanski W. (1974). Analysis of the pattern of ejaculation in stallions. 1. *Reprod. Fert.*, 41, 329-335.

Tischner M. (1979). Evaluation of deep-frozen semen in stallions. *J. Reprod. Fert., Suppl.*, 27, 53-59.

Tischner M. et Kosiniak K. (1992). Techniques for collection and storage of stallion semen with minimal secondary contamination. *Acta Vet. Scand. Suppl.*, 88, 83-90.

Trimeche A. (1996). Etude sur la fertilité et la cryopréservation du sperme du baudet du Poitou. Thèse, d'université de Rennes I.

Trimeche A., P. Renard, D. Le Lannou, P. Barrière and D. Tainturier (1996). Improvement of motility of post-thaw Poitou jackass sperm using glutamine. *Theriogenology. In Press.*

Vidament Marianne, Magistrini Michèle, Couty Isabelle et Palmer E. (1993). La semence congelée d'étalon : données expérimentales et de terrain. 19ème journée d'étude, CEREOPA, 3 mars.