

CONSERVATION *IN VITRO* DU SPERME CHEZ LES OISEAUX DOMESTIQUES

Blesbois Elisabeth, Seigneurin François

INRA, Station de Recherches Avicoles, 37380 Nouzilly, France

Résumé

Cet article présente une revue des principales méthodes de conservation du sperme chez les oiseaux domestiques (dindon, coq, canards, oie...). L'intérêt de ces méthodes et les facteurs de variation susceptibles d'influencer la survie des gamètes sont discutés. Le sperme est conservé à l'état liquide si le délai souhaité est inférieur à 24 h, ou bien congelé et stocké dans l'azote liquide pour des temps plus longs.

Abstract

In vitro storage of semen in domestic birds

This paper presents a review of the most current methods of *in vitro* storage of sperm in domestic birds. Their interest and the factors of variation which contribute to the success of *in vitro* storage are also discussed. To store semen up to 24 h, a method of storage upper 0°C is employed. Longer storages need freezing of semen.

Introduction

Depuis que Shaffner *et al.* (1941) ont montré que des oeufs fécondés pouvaient être obtenus à partir de sperme congelé de coq, de très nombreux travaux ont été entrepris pour améliorer les techniques de conservation du sperme chez les oiseaux domestiques. Très vite, les travaux initiés chez le coq ont été étendus au dindon puis au canard, au jar et à la pintade mâle.

Aujourd'hui, l'utilisation des techniques de conservation du sperme dépend à la fois de la qualité de la descendance obtenue, et du coût de cette descendance produite sur un marché très concurrentiel. De ce fait, deux types de méthodes de conservation *in vitro* du sperme ont été mises au point:

- l'une principalement liée à la technologie de l'insémination artificielle (I.A.) est la conservation "à l'état liquide" au dessus de 0°C du sperme (temps $\leq$ 24-48 h).
- l'autre, plus coûteuse est premièrement développée dans l'optique de conservation des gènes (plusieurs mois-années). Il s'agit de la congélation.

Nous allons successivement étudier ces deux familles de techniques, leur impact et leurs facteurs limitants.

I. Conservation du sperme au dessus de 0°C

Développée pour faciliter l'organisation des I.A. lorsque ce mode de reproduction est utilisé, la conservation *in vitro* du sperme au dessus de 0°C est principalement développée chez le dindon. Des méthodes efficaces existent aussi chez le coq et sont utilisées à travers le monde : elles concernent surtout les souches grand parentales. En revanche peu

d'études ont été menées chez des espèces comme la pintade et le canard, alors que l'I.A. est largement employée désormais dans ces deux espèces.

En règle générale l'objectif est de conserver les gamètes mâles de 4 à 24 h sans perte de pouvoir fécondant. Celui-ci a été concrétisé chez le coq (Lake et Ravie, 1981 ; Blesbois et Hermier, 1990) comme chez le dindon (Thurston, 1994). Cependant, même chez ces deux espèces, la réussite de la conservation du sperme dépend d'un grand nombre de facteurs de variations qui sont liés soit aux animaux (qualité du sperme, fertilité de la femelle, âge) soit aux techniques de collecte, de conditionnement et d'insémination du sperme.

1. Facteurs liés aux animaux :

La première exigence est de disposer de spermatozoïdes de bonne qualité. En effet, la conservation *in vitro* est susceptible d'amplifier une subfertilité latente. Par exemple, la présence d'un faible pourcentage de cellules altérées, peut, par libération d'enzymes protéolytiques ou de produits de peroxidation, entraîner progressivement la mort des autres cellules.

De plus, il est désormais bien établi que la capacité propre des femelles à conserver *in vivo*, de façon optimale les spermatozoïdes, peut être aussi prépondérante.

Enfin, l'âge des animaux est aussi un facteur important dans les deux sexes, le vieillissement produisant chez le mâle une chute de la quantité et de la qualité des gamètes (de Reviers et Petitjean, 1973) et chez la femelle une diminution de sa capacité à stocker les spermatozoïdes (Brillard, 1993).

2. Facteurs liés au conditionnement du sperme :

a. *La collecte du sperme* : Depuis les travaux de Burrows et Quinn (1936), les techniques de massage pour recueillir le sperme ont été progressivement adaptées et étendues à toutes les espèces d'oiseaux domestiques. Elles présentent cependant des particularités d'espèce susceptibles de conditionner la conservation ultérieure des spermatozoïdes. Ainsi, chez le coq, il faut éviter de recueillir le fluide transparent qui est néfaste au stockage *in vitro* des cellules (Lake, 1966). Il faut en revanche, chez toutes les espèces, surveiller les contaminations du sperme par les microorganismes du cloaque (Gale et Brown, 1960) et dans certains cas, avoir recours aux antibiotiques qui n'excluent pas l'utilisation de systèmes simples de filtration (Brillard, 1995).

b. *Milieu de conservation des spermatozoïdes* : Lors des cinquante années écoulées, de très nombreux dilueurs de conservation du sperme ont été proposés (revu par Thurston, 1994 ; Surai et Wishart, 1996). Dans la plupart des cas, ces dilueurs donnent, à très court terme, des résultats comparables. Retenons les facteurs qui contribuent le plus à l'efficacité d'un dilueur : ils sont premièrement d'ordre physico-chimique puisqu'il s'agit de la pression osmotique, du pH et du pouvoir tampon. La conservation des spermatozoïdes est de plus bien meilleure quand leur métabolisme est abaissé. Cet abaissement est, en général, réalisé par une température de stockage infra physiologique, souvent de 2 à 15°C et d'autant plus basse que la survie est prolongée. Dans ces conditions, la présence d'oxygène pour le maintien d'un métabolisme aérobie reste très utile chez le coq (Wishart, 1981 ; Blesbois et Mauger, 1987 ; Wishart, 1989) et impérative chez le dindon (Lake *et al.*, 1984 ; Thurston *et al.*, 1994). Dans les deux cas, l'apparition de peroxydes néfastes à la survie des gamètes peut être contrôlée par des antioxydants adaptés (Blesbois *et al.*, 1993 ; Surai et Wishart, 1996). Notons aussi que le plasma séminal a globalement un effet néfaste sur la conservation du sperme (Blesbois, 1986 ; Sexton, 1988). Son effet toxique est concentré dans les molécules de petit poids moléculaire (P.M.), les fractions de haut P.M. étant au contraire bénéfiques (Blesbois et de Reviers, 1992).

c. *Inséminations* : La fréquence des I.A. avec sperme conservé au dessus de 0°C est en général de 1/semaine chez le dindon comme chez le coq. La qualité des I.A. est très importante. Ainsi, pour une dose fixe d'insémination de 250 millions de spermatozoïdes/semaine, Sexton (1990) obtenait les meilleurs résultats quand la dose était répartie en plusieurs inséminations dans la semaine, sans doute parce qu'une proportion moins élevée de dindes étaient "ratées" (chez la poule, le pourcentage d'IA "ratées" pour des raisons diverses serait de l'ordre de 3 %, Brillard, Comm. Personnelle).

II. Congélation du sperme

Le premier intérêt de la congélation est de pouvoir ainsi conserver les gènes sans conserver les animaux. En l'absence de conservation efficace des embryons ou des ovocytes, il n'y a, en effet, pas de méthode alternative chez les oiseaux. Ceci est très important, bien sûr, pour les races en voie de disparition mais aussi pour conserver le potentiel de reproducteurs à haute valeur ajoutée. La congélation peut alors, dans certains cas, être envisagée en multiplication. Elle permet aussi de conserver la diversité génétique dans des situations difficiles comme celles rencontrées au cours d'épidémies (biosécurité).

Le sperme est alors congelé plusieurs mois à plusieurs années dans l'azote liquide avant d'être réinséminé. Chez les oiseaux, Lake et Ravie (1978) et Sexton (1976) ont été les premiers à proposer des méthodes de congélation du sperme de coq. Leurs méthodes ont été récemment améliorées respectivement par Seigneurin et Blesbois (1995) et par Van Voorst et Leenstra (1996). D'autres méthodes de congélation du sperme de coq mais aussi de dindon, jar et canard, développées en Europe de l'Est sont aujourd'hui plus facilement disponibles (Tselutin *et al.*, 1995 ; revue de Surai et Wishart, 1996).

Comme pour la conservation du sperme au dessus de 0°C, de nombreux facteurs conditionnent la réussite de la congélation. En réalité, la plupart des facteurs de variation ayant un rôle dans la conservation du sperme à court terme sont encore plus importants pour le sperme congelé. C'est le cas pour ce qui concerne les animaux (qualité du sperme, fertilité des femelles, âge), les techniques de collecte et d'inséminations. De plus, les milieux de stockage doivent être tout aussi équilibrés. Quelques facteurs sont cependant propres à la congélation. Il s'agit des cryoprotecteurs, des vitesses de congélation et décongélation, ainsi que du mode de stockage du sperme.

1. Agents cryoprotecteurs :

Indispensables à la réussite de la congélation des gamètes, de très nombreux cryoprotecteurs perméants et non perméants ont été testés chez les spermatozoïdes d'oiseaux. Le glycérol reste le meilleur d'entre eux (Blesbois et Seigneurin, 1996) mais il a l'inconvénient majeur de devoir être enlevé avant l'insémination. Ceci est réalisé par centrifugation (Lake et Ravie, 1978) ou dialyse (Bush, 1993). Des résultats encourageants ont aussi été obtenus avec le DMSO (Van Voorst et Leenstra, 1996) et le DMA (Tselutin *et al.*, 1995).

2. Vitesses de congélation et décongélation :

Les vitesses de congélation et de décongélation optimales dépendent du ou des cryoprotecteurs employés. Elles visent à rechercher un équilibre adéquat entre (1) les effets osmotiques liés aux

mélanges transitoires des phases liquides et solides et (2) la présence et la taille des cristaux de glace intracellulaires. Pendant longtemps, une vitesse de congélation lente ($\leq 1^\circ\text{C}/\text{mn}$) et une vitesse de décongélation rapide étaient préconisés. L'évolution des connaissances conduit à proposer des vitesses de congélation de plus en plus rapides.

3. Mode de stockage du sperme :

Trois modes principaux de stockage du sperme dans l'azote liquide ont été proposés : les billes (pellets), les ampoules de verre et les paillettes. Le conditionnement en billes, largement développé dans les pays de l'ancienne URSS, consiste à plonger directement des gouttes de sperme dans l'azote liquide. D'un usage simple, les billes posent pourtant des problèmes sanitaires et d'identification majeurs. Le conditionnement en ampoules de verre a principalement été employé dans la méthode de Lake. Il est progressivement remplacé à travers le monde par la paillette qui produit des congélations beaucoup plus homogènes.

Conclusion

Les méthodes de conservation du sperme au dessus de 0°C sont maintenant d'un usage courant chez le dindon. Les méthodes de congélation du sperme chez les oiseaux ont, quant à elles, considérablement évolué ces dernières années. Elles permettent, à l'heure actuelle d'atteindre des taux de fécondation de 80 à 90% dans certaines conditions. Il n'en demeure pas moins que les résultats obtenus sont d'une variabilité considérable en fonction des animaux (revue de Hammersted, 1994). Cette variabilité pourrait d'ailleurs être atténuée si l'on prenait en compte certains paramètres de reproduction dans les critères de sélection (Ansah et Buckland, 1983).

Dans tous les cas, l'amélioration des méthodes de conservation du sperme avec ou sans congélation conduit à une optimisation du management des mâles et contribue largement à la diffusion des progrès génétiques réalisés chez les oiseaux domestiques.

Références

- Ansah G.A., Buckland R.B., 1982. *Poult. Sci.*, 61, 623-637.
- Blesbois E., 1986. 7th Eur. Poult. Conf., Paris Vol. 2, pp. 1009-1015.
- Blesbois E., Hermier D., 1990. *J. Reprod. Fertil.* 90, 473-482.
- Blesbois E., de Reviers M., 1992. *J. Reprod. Fertil.* 95, 263-268.
- Blesbois E., Grasseau I., Blum J.C., 1993. *Theriogenology*, 39, 771-779.
- Blesbois E., Seigneurin F., 1996. 20th World's Poult. Cong., New-Delhi, (India) 2-5 sept, Vol. 6, p. 85.
- Brillard J.P., 1993. *Poult. Sci.* 72, 923-928.
- Brillard J.P., 1994. 1st Int. Symp. AI of Poultry. (Bakst, Wishart, edit.) *Poult. Sci. Ass., Savoy, (USA)*, 176-183.
- Burrows W.H., Quinn J.P., 1936. *Poult. Sci.*, 16, 19-24.
- Bush E.G., 1993. *Poult. Sci.*, 72, 944-954.
- Gale C., Brown K.I., 1960. *Poult. Sci.*, 40, 50-55.
- Hammerstedt R.H., 1994. 1st Inter. Symp. on AI of Poultry. (Bakst, Wishart edit.) *Poult. Sci. Ass., Savoy, (USA)* 229-251.
- Lake P.E., 1966. in: *Advances in Reprod. physiol.*, (Mc Laren edit.) Loges Press, London, (GBR) 93-123.
- Lake P.E., Stewart J.M., 1978. *Brit. Poult. Sci.*, 187-194.
- Lake P.E., Ravie O., 1980. 9th Intern. Cong. on Anim. Reprod. and AI, Madrid, (ESP).
- Lake P.E., Ravie O., 1981. *Reprod. Nutr. Develop.*, 21, 1077-1084.
- Lake P.E., Chermis F.L., Wishard G.J., 1984. *Reprod. Nutr. Develop.*, 24, 59-65.
- de Reviers M., Petitjean M.J., 1973. *Ann. Génét. Sél. Anim.*, 5, 313-321.
- Seigneurin F., Blesbois E., 1995. *Theriogenol.*, 43, 1351-1358.
- Sexton T.J., 1976. 8th Intern. Cong. on Anim. Reprod. and AI. Karkow, (Pologne) Vol. 4, 1079-1082.
- Sexton T.J., 1988. *Theriogenol.*, 30, 711-720.
- Sexton T.J., 1990. *Arch. Geflüg.*, 54, 29-33.
- Shaffner C.S., Henderson E.W., Card C.G., 1941. *Poult. Sci.*, 20, 259-265.
- Surai P.F., Wishart G.J., 1996. *World's Poult. Sci. J.*, 52, 27-39.
- Tselutin K., Narubina L., Mavrodina T., Tur B., 1995. *Brit. Poult. Sci.*, 36, 805-812.
- Thurston R.J., 1994. 1st Intern. Symp. on the AI of Poultry. (Bakst, Wishart edit.) *Poult. Sci. Ass., Savoy, (USA)*.
- Van Voorst A., Leenstra F.R., 1995. *Poult. Sci.*, 74, 136-140.
- Wishart G.J., 1981. *Brit. Poult. Sci.*, 22, 445-450.
- Wishart G.J., 1989. *Brit. Poult. Sci.*, 30, 443-454.