

CRYOCONSERVATION DU SPERME DE COQ

Seigneurin F. ¹, Blesbois Elisabeth ²

¹SYSAAF, ²INRA, Station de Recherches Avicoles, 37380 Nouzilly.

Résumé

Les deux principales techniques de congélation du sperme de volailles décrites dans la bibliographie (Lake, 1978, Sexton, 1980) ont été testées dans des conditions d'application. La supériorité du glycérol, comme agent cryoprotecteur, a été confirmée. Les taux de survie des spermatozoïdes (20% vs 10%) et les taux de fertilité (46% vs 35%) sont supérieurs lorsque les éjaculats de coq sont congelés en présence de 11% de glycérol plutôt que de 4% de DMSO. Dans le modèle animal que nous avons utilisé (coq), nous nous sommes attachés à améliorer les étapes de précongélation et de retrait du glycérol. Nos observations nous ont permis d'augmenter les taux de survie des spermatozoïdes et les taux de fertilité obtenus par rapport à la technique initiale. L'étude des vitesses de congélation montre que, dans nos conditions, une vitesse de $-7^{\circ}\text{C}/\text{mn}$ améliore les résultats de fertilité obtenus par rapport à la méthode initiale, et conduit, de façon régulière, à des taux de fertilité de l'ordre de 75%.

Introduction

Contrairement aux mammifères, chez lesquels la conservation de la semence par congélation est plus ou moins largement utilisée suivant les espèces, cette technique de conservation prolongée de la fécondance des gamètes mâles n'est pas opérationnelle actuellement chez les oiseaux en général, ni chez les volailles en particulier. Elle intéresse pourtant les amateurs, collectionneurs de races de petit effectif, autant que les sélectionneurs avicoles, car elle permet d'envisager un conservatoire du patrimoine génétique et une protection des lignées commerciales.

Depuis 1991 le SYSAAF (Syndicat des Sélectionneurs Avicoles et Aquacoles Français) a développé un programme de travail sur la cryoconservation du sperme de volailles. Les travaux ont été réalisés en collaboration avec la Station de Recherches Avicoles (INRA de Nouzilly), grâce à l'appui financier du Ministère de L'Agriculture.

Au plan historique, l'étude de la congélation du sperme de coq a été abordée dès les années cinquante. Deux auteurs (Lake, 1978 et Sexton, 1986) ont proposé chacun une technique, la première utilisant le glycérol comme agent cryoprotecteur et la deuxième le DMSO (diméthyl sulfoxyde). L'une et l'autre font appel à une vitesse de congélation lente ($-1^{\circ}\text{C}/\text{mn}$).

Cependant à l'heure actuelle aucune n'est utilisée en pratique car les résultats de fertilité obtenus sont: 1) peu élevés, 2) difficilement reproductibles sans tri préalable des mâles.

L'objectif des travaux, présentés dans cette communication, après avoir retenu comme "base de référence" la technique qui nous paraissait la meilleure, était d'optimiser chacune des étapes du processus de cryoconservation, afin de disposer d'une méthode opérationnelle, la plus simple possible et permettant d'obtenir des taux de fertilité suffisants pour permettre la conservation d'un patrimoine génétique dans l'espèce Gallus.

Résultats

1) Comparaison des deux techniques

La mise en œuvre des deux techniques a été réalisée, telles qu'elles ont été présentées par leur auteur. Dans un souci d'application, les animaux n'ont été triés ni sur le taux de ponte des poules, ni sur la production spermatique ou la qualité des éjaculats des coqs. Des éjaculats mélangés de 12 à 15 coqs ont été congelés, conservés à -196°C dans l'azote liquide (de quelques heures à quelques jours), puis décongelés et leur qualité a été estimée par des tests *in vitro* (survie) et *in vivo* (fertilité).

Les résultats montrent que la technique basée sur l'utilisation du glycérol se révèle, pour le coq, plus efficace que celle utilisant le DMSO.

Avec le glycérol, les taux de survie des spermatozoïdes (20% vs 10%) et les taux de fertilité (46% vs 35%) obtenus après insémination de ces spermatozoïdes sont supérieurs à ceux obtenus avec le DMSO. Compte tenu de ces résultats, seul le glycérol a été utilisé comme cryoprotecteur dans nos travaux ultérieurs. Néanmoins, le glycérol ayant une forte action contraceptive chez les oiseaux, il est nécessaire de le retirer du milieu après décongélation, avant l'insémination des poules.

2) Retrait du glycérol

D'après des travaux antérieurs (Lake, 1978), le retrait du glycérol nécessitait, jusqu'à ce jour, une importante redilution du sperme après décongélation (1/37), puis une centrifugation. Une dilution trop élevée exerce un effet néfaste sur le sperme des espèces avicoles (Sexton, 1974). Le taux de dilution a donc été testé.

TABLEAU 1: Effet du taux de redilution du sperme sur le taux de fertilité des œufs.

Taux de dilution	1/37	1/20	1/12	1/6
Taux de fertilité	41 ^{ab}	45 ^a	34 ^b	9 ^c

Les valeurs portant la même lettre ne sont pas significativement différentes ($P > 0,05$)

D'après nos résultats (tableau 2) le taux de redilution de 1/20, semble légèrement meilleur que celui de 1/37, bien que la différence ne soit pas significative. Il permet par ailleurs de simplifier la procédure de redilution en diminuant presque de moitié le volume de dilueur à rajouter. Les taux de fertilité obtenus avec des redilutions de 1/12 et 1/6 sont significativement inférieurs à ceux obtenus avec la dilution 1/20 ($P < 0,05$). Le volume de dilueur nécessaire au lavage des spermatozoïdes peut donc être réduit, par rapport à la technique initiale. L'ajout d'un volume de dilueur important (19/20ème du volume final) reste cependant nécessaire pour permettre un retrait efficace du glycérol.

3) Vitesses de congélation

Dans cette étude, notre but été de comparer les conséquences de plusieurs vitesses de congélation, entre +5°C et -35°C, sur la viabilité, la motilité et le pouvoir fécondant du sperme.

Les paillettes de sperme, placées dans un congélateur programmable, ont été congelées à des vitesses de -1°C/mn, -5°C/mn, -10°C/mn et -15°C/mn (expérience 1) ou de -5°C/mn, -7°C/mn et -10°C/mn (expérience 2). Dans les deux cas la vitesse de refroidissement a été de -8°C/mn de -35°C à -90°C puis les paillettes ont été plongées dans l'azote liquide.

TABLEAU 2: Incidences de la vitesse de congélation sur le taux de survie, la motilité et la fécondance de sperme congelé-décongelé (expérience 1).

Vitesses de congélation	-1°C/mn	-5°C/mn	-10°C/mn	-15°C/mn	Témoin Pur-frais
% spz vivants	34 ^c	48 ^b	47 ^b	46 ^b	93 ^a
% spz mobiles	21 ^d	41 ^b	36 ^{bc}	31 ^c	91 ^a
% fertilité	32 ^d	74 ^b	69 ^{bc}	58 ^c	95 ^a

Sur une ligne, les valeurs portant la même lettre ne sont pas significativement différentes ($P > 0,05$)

Les résultats du tableau 2 montrent que, quels que soient les critères mesurés, les résultats des lots congelés sont inférieurs au lot témoin dont le sperme est utilisé à l'état frais (intervalle collecte-insémination inférieur à 30 mn). La vitesse de -1°C/mn donne les résultats les plus bas pour tous les paramètres mesurés. Alors que les vitesses de -5°C/mn et -10°C/mn donnent, dans nos conditions, les meilleurs résultats.

L'expérience 2 a été réalisée pour préciser les résultats obtenus dans l'expérience 1.

Les résultats de l'expérience 2 (tableau 3) montrent des taux de fertilité inférieurs à ceux de l'expérience 1 pour les lots témoins (90% vs 95%), -5°C/mn (62% vs 74%) et -10°C/mn (41% vs 69%). Il peut s'agir d'un effet de l'âge du troupeau expérimental (plus âgé que dans l'expérience 1).

La vitesse intermédiaire de $-7^{\circ}\text{C}/\text{mn}$ donne clairement de meilleurs taux de fertilité (76%) que les autres lots congelés.

TABLEAU 3: Incidence de la vitesse de congélation sur la fécondance de sperme congelé-décongelé (expérience 2).

Vitesses de congélation	$-5^{\circ}\text{C}/\text{mn}$	$-7^{\circ}\text{C}/\text{mn}$	$-10^{\circ}\text{C}/\text{mn}$	Témoin Pur-frais
% fertilité	62 ^c	76 ^b	41 ^d	9 ^a

Sur une ligne, les valeurs portant la même lettre ne sont pas significativement différentes ($P>0,05$)

Conclusions

Après avoir confirmé: 1) que le glycérol avait une meilleure action cryoprotectrice que le DMSO et 2) que la méthode de retrait du glycérol pouvait être améliorée par rapport à la technique proposée à l'origine, l'étude complémentaire des vitesses de congélation nous indique que, lorsqu'elles sont comprises entre $-5^{\circ}\text{C}/\text{mn}$ et $-10^{\circ}\text{C}/\text{mn}$ (expérience 1) les performances de survie *in vitro* ainsi que la fécondance *in vivo* sont améliorées de manière conséquente par rapport à la vitesse de référence de $-1^{\circ}\text{C}/\text{mn}$. Nous confirmons clairement ces résultats dans notre expérience complémentaire (expérience 2) où nous précisons que la vitesse de congélation la plus appropriée au sperme de coq, dans nos conditions expérimentales, est $-7^{\circ}\text{C}/\text{mn}$.

Ces travaux ont permis d'améliorer, de façon sensible, la méthode initiale de congélation du sperme de coq utilisant le glycérol comme agent cryoprotecteur.

L'état actuel de la technique permet d'obtenir en routine des taux de fertilité de l'ordre de 75% avec des éjaculats mélangés de sperme de coq inséminés à raison de 400 millions de spermatozoïdes par femelle au rythme de 2 inséminations par semaine.

Ces résultats sont d'ores et déjà compatibles avec la conservation d'un patrimoine génétique.

Les perspectives sont une extension de la technique aux autres espèces de volailles, accompagnée, si possible, d'une simplification de la méthode afin de la rendre plus facilement opérationnelle.

Références

- Lake, P.E. and Stewart, J.M. 1978. Br. Poult. Sci. 19:187-194.
- Lake, P.E. and Ravie, O. 1979. J. Reprod. Fert. 57:149-155.
- Seigneurin F. and Blesbois E. 1995. Theriogenology (accepté, sous presse).
- Sexton T.J. 1974. Poult. Sci. 53:1977.
- Sexton T.J. 1980. Poult. Sci. 59:2765-2770.