

UTILISATION D'UN SYSTEME D'ANALYSE DE SEMENCE ASSISTE PAR ORDINATEUR POUR LA PREDICTION DE LA FERTILITE EN POULE PONDEUSE

Belletante Stéphane¹, Camus Agnès², Fablet Julien¹, Faure Mailys¹

¹HENDRIX GENETICS – 1 rue Jean Rostand - 22440 PLOUFRAGAN,

²IMV Technologies – ZI 1 Est - 61300 L'AIGLE

Stephane.belletante@hendrix-genetics.com

RÉSUMÉ

La réussite d'inséminations artificielles dépend de la qualité de la semence. La semence de volaille est aujourd'hui moins caractérisée en routine que celle d'autres espèces. Les systèmes d'analyse de semence assisté par ordinateur (CASA- Computer Assisted Semen Analysis) constituent une méthode objective et standardisée pour caractériser la semence. Cependant les algorithmes ne sont pas encore totalement adaptés pour les spermatozoïdes (spz) de volailles.

Cette étude a pour but d'une part d'évaluer la corrélation entre les paramètres in vitro de la semence de coqs par le système CASA et la fertilité et d'autre part, de déterminer une notation synthétique individuelle de qualité de semence en tant qu'outil d'aide à la prédiction de la fertilité des coqs.

Lors de cette étude, 2 groupes de 115 et 120 coqs ont été utilisés. À partir de la troisième collecte, la semence des différents coqs a servi pour inséminer individuellement différents lots de poules. La mise en incubation des œufs a permis d'obtenir la fertilité apparente et la fertilité vraie. Les paramètres obtenus par le système CASA ont été comparés en fonction de ces fertilités (proportion de différents types de spermatozoïdes, vitesse, taille, etc.). L'analyse statistique a été effectuée grâce à des tests de corrélation en utilisant les résultats pour chaque coq.

L'étude a permis de démontrer que certains paramètres sont corrélés à la fertilité vraie (proportion des différentes catégories de spermatozoïdes, fréquence moyenne des mouvements de tête et surface des spermatozoïdes). Une notation corrélée à la fertilité a ainsi pu être obtenue ($R^2 = 0,8$ pour la fertilité vraie et $R^2 = 0,7$ pour la fertilité apparente).

Cette étude a permis de confirmer que les systèmes CASA peuvent être des outils d'aide à la prédiction de la fertilité des coqs utilisés pour l'insémination artificielle des lignées de poules pondeuses.

ABSTRACT

Use of computer assisted semen analysis (CASA) for predicting layer fertility

The success of artificial inseminations depends on the quality of semen. Poultry semen is nowadays less analysed routinely than other species. Automatic semen analysers (CASA- Computer Assisted Semen Analysis) are therefore an objective and standardised alternative for characterizing semen. However, these are parameterized for the morphology of mammalian spermatozoa nevertheless those of poultry are very different.

In this study, the objectives are first to determine the characters correlated with fertility and then to determine a predictive notation of fertility.

As part of the study, 2 groups of 115 and 120 roosters have been used. From the different third harvest, the semen of the various roosters was also used to inseminate individually different pools of hens. Eggs incubated allowed us to obtain apparent fertility and true fertility. The different characters obtained by the analyser were compared according to these fertilities. The statistical analysis was conducted through correlation tests using the results for each rooster.

The study demonstrated that some traits were correlated with true fertility (proportion of different types of sperm, average frequency of head movements and surface area of sperm). A correlated rating with fertility was thus obtained: $R^2 = 0,8$ with true fertility and $R^2 = 0,7$ with apparent fertility.

This study allows us to confirm that semen analysers could predict the fertility of rooster on laying hen lines for artificial insemination.

INTRODUCTION

Les insémination artificielles (IA) en volaille sont majoritairement réalisées à partir de doses issues de pool de semence. Dans le cadre de la sélection des lignées pures, les IA sont réalisées à partir de doses issues d'éjaculats individuels. Différentes méthodes existent pour qualifier la semence des coqs. Cependant, celles-ci ne sont pas répétables et sont dépendantes du facteur humain. Cette étude propose de déterminer les meilleurs coqs de manière précoce pour la reproduction afin de maximiser le nombre d'œufs fécondés. Il existe aujourd'hui un système CASA constitué d'un microscope relié à un logiciel d'acquisition et traitement des images permettant une qualification objective de la semence. Cette machine est principalement utilisée en routine dans les centres de production de semence bovin, porcin et équin, et dans les centres de recherches. Le paramétrage du logiciel en semence avicole permet une bonne analyse des cinétiques et de la concentration toutefois n'est pas encore aussi abouti que celui en mammifère pour l'analyse morphologique.

De nombreux critères environnementaux peuvent faire varier la qualité de la semence comme l'âge, l'alimentation, la durée de lumière, le nombre de prélèvements, les entraînements, etc. (Sauveur, 1988). Avant l'âge de 37 semaines, la qualité de la semence n'est pas stable (Cooper, 1965; Weil et al., 1999; Parker et al., 2002).

Par ailleurs, les entraînements constituent une partie très importante dans la vie d'un coq reproducteur en insémination artificielle (Cooper, 1965; Sauveur, 1988). Les animaux vont pouvoir s'habituer à cette manipulation et leur semence analysée permettra d'identifier les animaux capables de produire le maximum de semence de bonne qualité. Des études similaires ont été réalisées sur d'autres espèces avicoles et ont donné des résultats satisfaisants notamment sur le pigeon, la caille et la dinde (King et al., 2000; Klimowicz et al., 2008; Farooq et al., 2018). L'objectif de cette étude est d'évaluer la corrélation entre les paramètres du CASA et la fertilité des coqs permettant ainsi de créer un outil d'aide à la prédiction de la fertilité via une notation synthétique individuelle de qualité de semence.

MATERIEL ET METHODES

Pour cette étude, deux groupes de coqs ont été utilisés, le premier de 115 et le second de 120 animaux âgés de 23 semaines chacun. Les coqs ont tous été identifiés avec un numéro individuel. La semence des individus du premier groupe a été analysée à partir de la première récolte jusqu'à la troisième. Les analyses des premières récoltes ont permis de démontrer que la qualité de semence était optimale à partir de la

troisième récolte. La quatrième, la septième et la huitième récolte ont été analysées et utilisées pour les calculs des corrélations. Pour le second groupe, seules les données de la sixième et la septième récolte ont pu être analysées et utilisées pour les calculs des corrélations.

Pour chaque analyse, la semence a été conservée à température ambiante.

L'analyse de la qualité de la semence a été effectuée grâce à l'analyseur CEROS II (Hamilton Thorn, Boston USA). Pour cela, la semence a été diluée avec le milieu de conservation de semence (réf 020070 IMV, l'Aigle -France) à 50/50. Un échantillon de 10 microlitres a été prélevé après dilution. Enfin, ce mélange a été dilué dans 2 millilitres de dilueur (Embryo Holding medium ref 019449 IMV, l'Aigle France). Chaque échantillon dilué (3 microlitres) est monté par capillarité dans une chambre d'analyse d'une lame Leja de 20 µm de profondeur, préchauffée à 37°C. Pour chaque échantillon, un minimum de 400 spermatozoïdes (spz) ou 8 champs a été analysé. Pour chaque capture le playback a été vérifié pour s'assurer de la bonne détection des spz afin de garantir sa qualité et sa fiabilité.

La semence des coqs a été utilisée pour inséminer individuellement un lot de poules 2 fois par semaine en suivant la méthode classique (Burrows, Quinn, 1937). Brièvement, les coqs ont été massés sur la partie cloacale puis une pression sur le cloaque a été appliquée pour récolter la semence dans un tube annoté et préalablement rempli de milieu pour semence (réf 020070 IMV, l'Aigle -France).

Les œufs ont été numérotés lors du ramassage avec l'identifiant correspondant à chaque coq.

Par la suite, les œufs ont été incubés 18 jours. Lors du 18^{ième} jour, les œufs ont été mirés et les œufs fécondés ont été placés en éclosiers. Cela a permis d'obtenir la fertilité apparente.

$$\text{taux de fertilité apparente} = \frac{\text{nombre d'œufs gardés au mirage}}{\text{nombre d'œufs total}}$$

Les œufs non gardés ont été analysés un par un. Les œufs fécondés avec morts embryonnaires ont été ainsi additionnés aux autres œufs fécondés pour obtenir la fertilité vraie. Les œufs non éclos ont aussi été vérifiés afin de savoir si certains pouvaient être non fécondés. L'analyseur nous a permis d'obtenir les données suivantes :

- La proportion de spz progressifs qui sont caractérisés par une vitesse élevée avec une trajectoire linéaire. Ce sont les plus importants pour la fécondation. En effet lors de compétition de semence, ce sont les spz les plus motiles qui vont pouvoir migrer vers les SST (sperm storage tubule) ; (Birkhead et al., 1999).
- La proportion de spz motiles, ayant une vitesse intermédiaire.
- La proportion de spz lents.
- La proportion de spz statiques.

- La proportion de spz avec un défaut de trajectoire.
- La proportion de spz avec des défauts de morphologie (5 catégories).
- La fréquence de mouvement des spz.
- La taille des spz.

Analyses statistiques

L'analyse statistique a été réalisée sous XLSTAT (Data Analysis and Statistical Solution for Microsoft Excel; Addinsoft, Paris, France, 2017.6). Pour toutes les données mesurées, les moyennes, les médianes et les écarts-types ont été calculés. Une analyse de la variance a été réalisée sur les résultats des 2 groupes de coqs. Des tests de corrélation entre les différents caractères et la fertilité vraie et apparente ont été réalisés. Par la suite, des régressions linéaires ont été réalisées entre la note synthétique obtenue à l'issue des résultats de l'analyse de semence et les taux de fertilité.

RESULTATS ET DISCUSSION

Les corrélations entre les principaux caractères retenus et la fertilité vraie des différents coqs sont présentées dans le tableau 1. Les caractères sélectionnés étaient ceux présentant les corrélations les plus élevées ou avec une importance particulière vérifiée dans la bibliographie. L'un d'eux est la proportion des différents spz. En effet, plus un spz est motile, plus il a de chance d'être stocké dans les tubules des SST (Birkhead et al., 1999) et donc d'être utilisé pour la fécondation contrairement aux statiques ou aux lents. Le nombre total de spz est également primordial puisque plus il y a de spz, plus il y a de chance d'obtenir une fécondation jusqu'à un certain seuil (Sauveur, 1988). La proportion de spz présentant des anomalies morphologiques est utile puisqu'ils ne pourront atteindre les SST.

Les caractères importants pour la fécondation sont corrélés entre la fertilité et l'analyse du système CASA (de 0,218 à 0,562).

Dans le but de simplifier l'indication de qualité de semence pour chaque coq, une méthode de notation a été déterminée. Le tableau 2 récapitule la manière de noter la qualité de la semence (note sur 40 points). Cette notation a été effectuée pour le premier groupe à partir des données issues des récoltes 4, 7 et 8 ; et pour le second groupe des récoltes 6 et 7.

L'équation de la note totale est la suivante :

$$\begin{aligned}
 & \text{note totale} \\
 &= \text{note spermatozoïdes motiles} + 2 \\
 & \quad * \text{note spermatozoïdes progressifs} \\
 &+ \text{note spermatozoïdes lents} \\
 &+ \text{note spermatozoïdes statiques} + 2 \\
 & \quad * \text{note compte de spermatozoïdes} \\
 &+ \text{note spermatozoïdes présentant des malformations} \\
 &+ \text{note fréquence de mouvement} \\
 &+ \text{note taille des spermatozoïdes}
 \end{aligned}$$

Le coefficient 2 a été attribué aux caractères considérés comme les plus importants : la proportion de spz progressifs et le nombre total de spz.

Afin de prédire la fertilité, les corrélations entre cette notation et la fertilité vraie, ainsi que la fertilité apparente de chaque coq ont été calculées et sont présentées sur la figure 1 et la figure 2. Les notes sont corrélées avec la fertilité vraie ($R^2 = 0,8$) et la fertilité apparente ($R^2 = 0,7$). La notation liée à la fertilité vraie permet ainsi de prédire précocement la fertilité des coqs après des entraînements.

La figure 3 représente les notes des deux groupes de coqs en fonction de leur fertilité. Les deux groupes étaient différents. Le second groupe de coq a présenté en moyenne une semence de meilleure qualité (anova $p < 0,0001$).

Cette méthode permet de déterminer des effets inter groupe et intra groupe.

Les résultats confirment que plus la semence est de bonne qualité, plus la fertilité sera élevée au couvoir. Cependant, des améliorations pourraient être réalisées sur l'analyseur. En effet, il serait logique que la fréquence de mouvement soit corrélée positivement avec la fertilité alors que l'inverse a été observé. Le paramétrage du logiciel en semence avicole n'est pas encore aussi abouti que celui en mammifère pour l'analyse morphologique. Les spz de volailles ont en effet de nombreuses différences de morphologie avec ceux de mammifères. Ainsi tous les spz avec des malformations ne sont pas détectés et certaines malformations des mammifères ne sont pas présentes chez les oiseaux.

Après ces améliorations, la prédiction de la fertilité pourra sans doute être améliorée.

CONCLUSION

La fertilité des coqs peut être prédite précocement grâce à l'utilisation d'un système CASA et la détermination d'une notation. Cela permettrait de mieux utiliser les coqs pour les inséminations individuelles artificielles. Les paramètres utilisés sont fiables pour l'analyse, bien que des améliorations soient souhaitables pour l'analyse de la morphologie des spz.

Des essais additionnels pourraient permettre d'évaluer si cette notation est fiable tout au long de la vie des coqs sur des cycles plus longs et une utilisation non continue.

REMERCIEMENTS

Ce projet a été mené à bien grâce à la participation de Clément Duquenoy d'IMV Technologies ainsi que ses collègues. Je souhaite aussi remercier tous les collaborateurs d'Hendrix Genetics qui ont participé aux essais, que ce soit dans les fermes ou dans le département Recherche et Développement.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Birkhead T. R., Martínez J. G., Burke T., Froman D. P., 1999. Proceedings. Biological Sciences / The Royal Society 266(1430): 1759–1764.
- Burrows, W. H., and Quinn J. P., 1937. Poult. Sci. 16(1): 19–24.
- Cooper, D. M., 1965. World's Poult. Sci. J. 21(1): 12–22.
- Farooq U., Malecki I., Mahmood M., Martin G. B., 2018. Theriogenology 115: 23–29.
- King L. M., Holsberger D. R., Donoghue A. M., 2000. Journal of Andrology 21(1): 65–71.
- Klimowicz, M. D., Nizanski W., Batkowski F., Savic M. A., 2008. Theriogenology 70(1): 77–82.
- Parker H. M., Karaca A. G., Yeatman J. B., Frank L. R., McDaniel C. D., 2002. Poult. Sci. 81(2): 239–245.
- Sauveur B., 1988. In : Reproduction des volailles et production d'oeufs. Paris.
- Weil S., Rozenboim I., Degen A. A., Dawson A., Friedländer M., Rosenstrauch A., 1999. General and Comparative Endocrinology 115(1): 23–28.

Tableau 1 : Corrélation entre les différents caractères retenus et la fertilité vraie

Données recueillies	Unités	Corrélation avec la fertilité vraie
Proportion de spermatozoïdes motiles totale	%	0,562
Proportion de spermatozoïdes progressifs	%	0,305
Proportion de spermatozoïdes lents	%	0,425
Proportion de spermatozoïdes statiques	%	- 0,562
Compte total de spermatozoïdes	Nombre	0,218
Proportion de spermatozoïdes avec malformations	%	0,047
Moyenne fréquence de mouvements	Nombre	- 0,348
Moyenne taille spermatozoïdes motiles	Nombre	0,331

Tableau 2 : Notation de la qualité de semence de coq

Données recueillies		
Unité	Note	Coefficient
Proportion de spermatozoïdes motiles totale		
%	1 : de 0% à 25% - 2 : de 25,1% à 50% - 3 : de 50,1% à 75% - 4 : de 75,1 à 100%	1
Proportion de spermatozoïdes progressifs		
%	1 : de 0% à 25% - 2 : de 25,1% à 50% - 3 : de 50,1% à 75% - 4 : de 75,1% à 100%	2
Proportion de spermatozoïdes lents		
%	1 : de 0% à 25% - 2 : de 25,1% à 50% - 3 : de 50,1% à 75% - 4 : de 75,1% à 100%	1
Proportion de spermatozoïdes statiques		
%	1 : de 75,1% à 100% - 2 : de 50,1% à 75% - 3 : de 25,1% à 50% - 4 : de 0% à 25%	1
Compte total de spermatozoïdes		
Nombre	1 : de 0 à 100 - 2 : de 101 à 200 - 3 : de 201 à 300 - 4 : 301 ou plus	2
Proportion de spermatozoïdes avec malformations		
%	1 : 3,1% ou plus - 2 : de 2,1% à 3% - 3 : 1,1% à 2% - 4 : de 0% à 1%	1
Moyenne fréquence de mouvements		
Nombre	1 : 32 ou plus - 2 : de 30 à 31,9 - 3 : de 28 à 29,9 - 4 : 27,9 ou moins	1
Moyenne taille des spermatozoïdes		
Nombre	1 : 15,9 ou moins - 2 : de 16 à 16,9 - 3 : de 17 à 17,9 - 4 : 18 ou plus	1
Total	40	

Figure 1 : Taux de fertilité vraie en fonction de la note totale

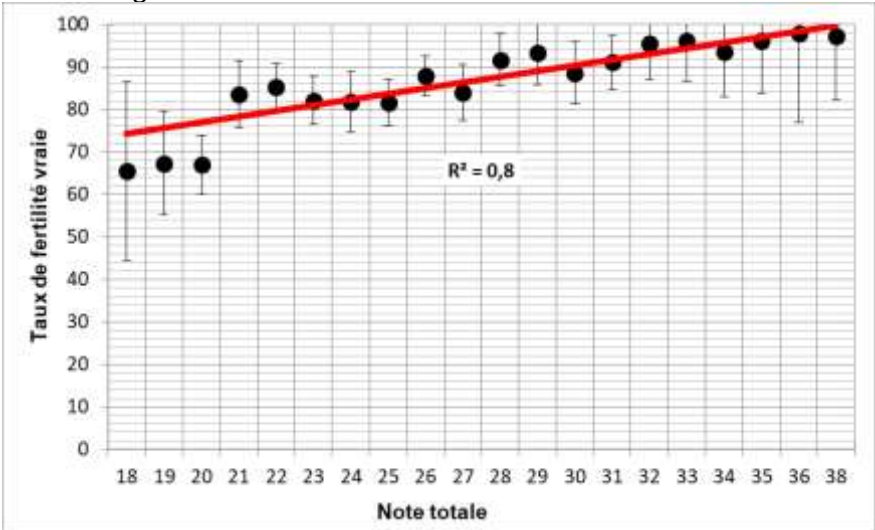


Figure 2 : Taux de fertilité apparente en fonction de la note totale

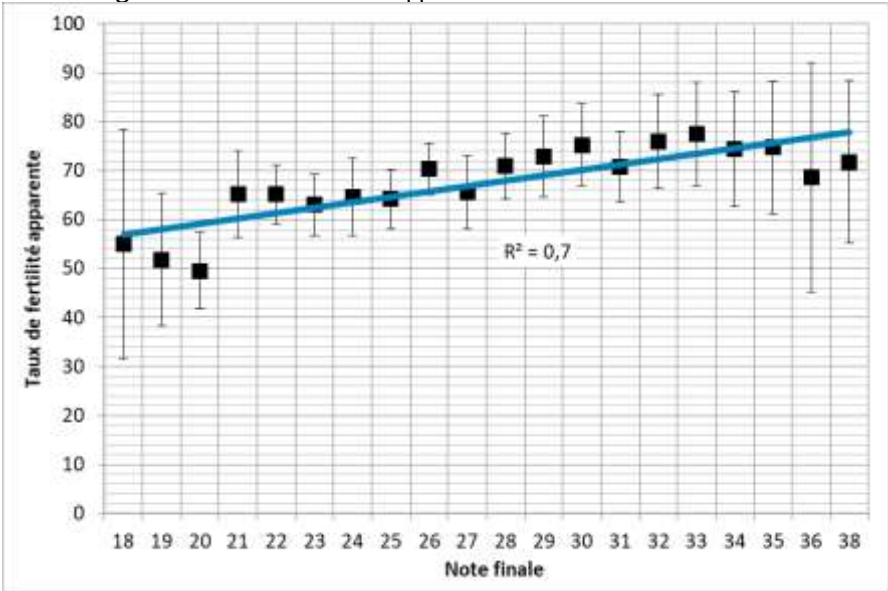


Figure 3 : Fertilité vraie des deux groupes de coqs en fonction de la note totale

