

Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia

AÑO XIX

BOGOTA, 1950

Nº. 101

Problemes de la Diluition Du sperme de Taureau

Par le Prof. Telesforo Banadonna, Directeur. — Instituto Sperimentale Italiano "Lazzaro Spallanzani" per la Fecondazione Artificiale.

Depuis 1940 la solution la plus employée dans le monde entier pour la diluition du sperme est celle préparée d'après la formule de Salisbury (1), composée de jaune d'oeuf très frais de poule, et sodium citrate dans de l'eau bi-distillée.

Cette solution a l'avantage d'être pratique, simple et peu coûteuse, comme reconnu par tous les Auteurs, et, paraît-il, même en Russie (2) où l'on voudrait remplacer les solutions de phosphate étudiée dans le passé par les Auteurs susdits (3)

Dans l'une de nos autres publications, outre la nécessité que le sodium citrate employé soit classifié "pur à l'analyse, nous avons souligné le fait que se produit peut cristalliser avec une quantité d'eau différente. Par conséquent, avec la variation du poids moléculaire, la concentration en gramme, de même, doit être différente.

Suivant les instructions du "Sub-Committee of the Breeding Committee of the American Dairy Science Association" en 1943: "The Organisation and Operation of Artificial Breeding Associations" l'on conseille d'ajouter 4,76 grammes de sodium citrate de la formule ($\text{Na}_3 \text{C}_6 \text{H}_5 \text{O}_7$); 11 H_2O dans 100 cc. deau bi-distillée, ou bien 3,92 grammes de sodium citrate de la formule $\text{Na}_3 \text{C}_6 \text{H}_5 \text{O}_7 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ toujours en 100 cc d'eau bi-distillée.

Salisbury, dans ses travaux originaux, nome une concentration pareille à M/15, c'est à dire à la quinzième partie du poids moléculaire. Salisbury et Willett conseillent de dissoudre dans 1 litre de H_2O bi-distillée, 47,615 grs. de sodium citrate à l'état cristallin et pur à l'analyse, en employant le sodium citrate de la formule $2 \text{Na}_3 \text{C}_6 \text{H}_5 \text{O}_7$; 11 H_2O .

Dans les instructions rédigées par la Rutgers University de New Jersey, on trouve les indications suivantes: "Dissolve 36 grams of crystalline sodium citrate $\text{Na}_3 \text{C}_6 \text{H}_5 \text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ in one liter (1000 ml) of water distilled over glass. pH buffer 6.7 to 6.8".

Nous avons obtenu les meilleurs résultats en dissolvant en 1000 grs. d'eau bi-distillée 39,20 grs. de sodium citrate (neutre tri-sodique) de la formule suivante:

$\text{CH}_2 \text{COO Na}$

I

$\text{C(OH)-COO Na} + 2 \text{H}_2\text{O}$

I

$\text{CH}_2 - \text{COO Na}$

Suivant les premières indications de Salisbury et ses collaborateurs la solution devait être préparée en mélangeant en proportions égales la solution de sodium citrate et le jaune d'oeuf de poule. Des recherches supplémentaires ont démontré que, en cas de nécessité, on peut mélanger dans les proportions d'un volume de jaune d'oeuf et 3-4 volumes de solution de sodium citrate:

Salisbury, Beck, Cripps and Elliott

(4) ont publié en 1943 les premiers résultats sur les degrés de fécondation obtenus dissolvant le sperme de taureau dans la solutions susdite et dans la proportion de 1 volume de sperme et 14-16 volumes de solution. En 1945 Salisbury, Elliott et van Denmark (5) démontrèrent que la proportion pouvait être élevée jusqu'à 1:50 volumes. En 1946 Salisbury (6) reporta les résultats obtenus avec des dilutions de 1:60, 1:80, 1:100 volumes pourvu que le nombre des spermatozoides injectés dans l'appareil

génital de la femelle ne soit pas inférieur aux 12.000.000.

Willet, à son tour, reporta en 1947 d'être en train de faire des recherches au cours desquelles il avait employé des dilutions jusqu'à 1:150 volumes (7).

Plus récemment ce même Auteur a reporté quelques unes de ses expériences avec sperme dilué de 1:100 à 1:300 volumes, tout en obtenant des degrés remarquables de fécondité à la première injection (Table I)

TABLE I

MOYENE DES NON-RETOURS ENCHALEUR, NOMBRE DES SPERMATOZOIDES ET SPERME DILUE' ENDIFFERENTES PROPORTIONS DANS LES QUATRE EXPERIENCES.

(Les numéros entre parenthèses signifiant le nombre moyen (en million) des spermatozoides par cc. de sperme dilayé)

Expe- rience	Inocu- lation	Pourcentage moyen des non-retours en chaieur et nombre des spermatozoides par cc. de sperme délayé.				
		100	125	150	200	300
I	2146	60.7 (12.3)	57.5 (9.8)	57.0 (8.2)	—	—
II	3449	68.3 (12.7)	—	68.3 (8.5)	65.6 (6.4)	—
III	1441	65.0 (10.1)	—	—	64.0 (6.6)	59.9 (4.44)
IV	4338	65.0 (10.1)	—	—	61.9 (5.1)	59.5 (3.44)

Salisbury et Bratton en 1948 (8) ont reporté leurs expériences d'insémination artificielle en employant sperme délayé à la proportion de 1:100, 1:150, 1:200, 1:300, 1:400 volumes, en obtenant un pourcentage de résultats positifs après une seule inoculation à peine plus bas qu'avec des dilutions moins élevées. Les meilleurs résultats ont été obtenus par ces Auteurs lorsqu'ils ont injecté a chaque vache de 5 à 10 millions de spermatozoides.

Il faut pourtant remarquer que Salisbury et Bratton avaient ajouté à la solution originale 33 mgr. de sulfonamide pour 100 ml. de solution.

Les premiers résultats obtenus de l'addition de sulfonamide au sperme de taureau furent annoncés par Knodt et Salisbury déjà en 1946 (9), et en 1947 ces mêmes Auteurs publièrent d'autres

donées expérimentales à ce sujet (10). Ils expliquent les avantages remarqués comme une action exercée sur le métabolisme du sperme, avec inhibition contemporaine du développement bactériologique. Cette dernière action a été démontrée par Foote et Salisbury en 1948 (11) en comparant l'action bactéricide de 20 différents sulfonamides, qui pourtant est résultée négative dans le cas du *Pseudomonas pyocyaneus*. L'addition d'autres agents antibiotiques, y compris la péniciline, n'a pas donné, en général, des résultats trop favorables, comme l'ont déclaré ces Auteurs mêmes en 1948 (12)

Karlshoj et Rasbeck en 1949 ont publié les résultats de quelques recherches sur la dilution du sperme de taureau. D'après ces résultats les solutions préparées avec rence appréciable dans la vitalité des les jaunes d'oeuf et avec l'addition de so-

dium citrate, sulfonamides et pénicilline auraient le pouvoir d'augmenter le degré de fécondité à la première inoculation (13).

Plusieurs autres Auteurs en Amérique et en Europe ont étudié le problème de la dilution du sperme en employant la formule originale de Salisbury et collaborateurs, avec ou sans l'addition de différents agents antibiotiques. Les résultats obtenus ont été pratiquement les mêmes.

Dimitropoulos, Hennaux et Cordiez en ajoutant 30 mg. de sulfanilamide à 10 cc de sperme délayé dans une solution de sodium citrate et jaune d'oeuf, ont remarqué après une conservation de 5-7 jours, une augmentation de 20 à 30% des spermatozoïdes vivants. La sulfanilamide n'a eu aucun effet sur la survivance des spermatozoïdes en présence du *Brucella abortus* et du *Bacterium coli* (14).

Hennaux, Dimitropoulos et Cordiez ont expérimenté l'effet de la Streptomycine sur la vitalité du sperme de taureau (15). De même Almquist, Glantz et Thorp ont remarqué l'effet bactéricide de la Streptomycine sur la vitalité et la flore bactérienne du sperme de taureau (16). En ajoutant cet antibiotique dans la dose de 0 à 2000 g. pour ml. de sperme délayé dans la proportion de 1:24 volumes avec solution de jaune d'oeuf et sodium citrate, ils, n'ont remarqué aucune différence appréciable entre la vitalité du sperme des spécimens contenant Streptomycine de 0 à 1000 m. pour ml. Cependant ils observèrent une grande diminution de la vitalité dans les spécimens contenant 1250, 1500 et 2000 de Streptomycine pour ml. de sperme.

En délayant le sperme de taureau avec la solution sodium citrate et jaune d'oeuf dans la proportion de 1:24, ces mêmes Auteurs n'ont remarqué aucune différence de spermatozoïdes pendant la conservation,

à 4-5° C. de la durée de 20 jours en ajoutant de 0 à 750 Unités Oxford de Pénicilline pour ml. de sperme délayé, ou de la durée de 6 jours en ajoutant de 250 à 1000 Unités Oxford de Pénicilline. Au contraire, une diminution appréciable de la vitalité des spermatozoïdes a été remarquée lorsque la Pénicilline était ajoutée en quantité supérieure aux 2000 Unités. Le pourcentage moyen des spermatozoïdes vivants pendant la conservation de 20 jours diminua de 0.9% pour chaque 250 Unités de Pénicilline ajoutée. L'addition de la Pénicilline au sperme de dilution récente et au sperme conservé pendant 8 jours a retardé le développement de la flore bactérienne.

En Scandinavie Romijn (18) a été à même d'établir que l'action du jaune d'oeuf frais ajouté au sperme de taureau en augmente la consommation d'oxygène. D'après cet Auteur il paraît que le sperme auquel le jaune d'oeuf n'a pas été ajouté ait une plus grande réduction de l'activité métabolique.

Les expériences faites auprès du Centre pour Taureaux de l'Institut et les observations statistiques confirment avant tout, la nécessité d'une extrême diligence soit dans la préparation de la solution, soit dans la vérification de l'origine des éléments qui la composent (sodium citrate chimiquement pur, oeuf de poule pondue plus de 24 auparavant, etc.), soit encore dans la parfaite correspondance entre la température du sperme et celle de la solution à l'époque de leur mélange.

Les hautes dilutions indiquées par d'autres Auteurs n'ont jamais été employées faute de nécessité. En effet, comme on peut le voir dans la Table II, la quantité totale de sperme obtenus des 5 taureaux pendant toute l'année est de 2.534 cc. et aurait été suffisante à elle seule à inséminer un nombre de vaches beaucoup plus élevé de ce qu'on a fait.

TABLE II

Quantité de sperme	Dilution	Dilution	Dilution	Dilution
	1:25	1:50	1:75	1:100
2.534 cc.	65.350 cc	126.700 cc	190.050 cc	253.400 cc
Vaches i. a. (1 cc Chaque)	65.350	126.700	190.050	253.400

d'autres Auteurs est d'accord sur trois observations d'importance pratique remarquable sur les quelles nous jugeons nécessaire attirer l'attention des opérateurs:

- a) Les dilutions au-dessous de 1:3-1:4 volumes ne sont pas avantageuses pour le moindre résultat technique de la dilution même. La quantité excédante du matériel fécondateur disponible peut être aisément éliminée sans causer aucun danger, tandis qu'il est toujours utile pouvoir disposer à chaque instant d'une quantité suffisante de sperme pour toute circonstance imprévues sans avoir recours à des récoltes supplémentaires.
- b) Le maximum du pouvoir fécondateur du sperme délayé se produit de 5 à 8 h. après la dilution. Pour cette raison on conseille aux Centres pour Taureaux d'organiser leurs procédés de façon que le sperme préparé ne soit jamais employé avant ce délai. Si les différentes opérations de préparation du sperme seront effectuées avec la plus grande diligence, il pourra être conservé pendant 36-49 h. sans difficulté.
- c) Le degré de dilution qui peut convenir au sperme est évidemment en relation au nombre des spermatozoïdes actifs et morphologiquement normaux, c'est à dire probablement féconds y contenus.

Salisbury, et Bratton (19), comme nous l'avons dit déjà, jugent qu'il suffit d'injecter dans le canal cervical des vaches qu'on doit inséminer artificiellement, de 5 à 10 millions de spermatozoïdes vivants et féconds. Malheureusement c'est difficile de juger le pourcentage de spermatozoïdes vivants et féconds contenus dans un spécimen de sperme (méthode de la chambre de comparaison (20) d'après Blom).

D'autre part le calcul des spermatozoïdes (méthode pour le calcul des glo-

bules, de l'opacimètre, etc.), ne peut pas être effectué chaque fois trop aisément.

On peut alors adopter la méthode suivante qui, quoique expérimentale, est suffisante dans la pratique. Comme tout le monde sait les caractéristiques du sperme peuvent être exprimées par la formule du sperme de chaque sujet, à voire:

DD = Sperme très dense avec plus de 2 millions de spermatozoïdes par mmc. (2 billions sus par cc.)

D = Sperme dense avec 800.000-2.000.000 de spermatozoïdes par mmc. (de 800 millions à 2 billions par cc.)

SD = Sperme demi-dense avec 500.000-800.000 spermatozoïdes par mmc. (de 500 à 800 millions par cc.)

R = Sperme clair avec moins de 500.000 spermatozoïdes par mmc. (moins de 500 millions par cc.)

O = Oligospermie (21) avec moins de 200.000 spermatozoïdes par mmc. (moins de 200 millions par cc.)

A = Absence de spermatozoïdes.

Par contre l'activité est exprimée en général d'après la méthode ainsi dite des cinquièmes, à voire:

5/5 si l'activité inclut de 80 à 100% des spermatozoïdes.

4/5 si l'activité inclut de 60 à 80% des spermatozoïdes.

3/5 si l'activité inclut de 40 à 60% des spermatozoïdes.

2/5 si l'activité inclut de 20 à 40% des spermatozoïdes.

1/5 si l'activité inclut de 0 à 20% des spermatozoïdes.

N s'il n'y a pas du tout d'activité.

La Table V indique les jugements qui pourraient être adoptés pour décider le degré de dilution du sperme en tenant compte de la concentration ou densité des spermatozoïdes et leur activité relative.

TABLE V

Activité (* - (**))	Trés dense (DD) diluition			Dense (D) Diluition			Démi-dense (SD) diluition		
	Min.	Moy.	Max.	Min.	Moy.	Max.	Min.	Moy.	Max.
5/5	50	100	150	20	50	100	5	10	30
4/5	25	50	80	10	25	50
3/5	5	10	20	3	8	10

(*) Le sperme clair (R) ne doit pas être employé.

(**) Le sperme avec une activité au dessous des 4/5 n'est pas trop indiqué pour l'insémination artificielle.

(1) *T. Bonadonna*. — "Orientamenti e metodi moderni per la diluizione del materiale spermatico bovini". (*Zootecnia e Veterinaria* N° 2, Février 1948)

(2) *V. K. Milovanov, I. I. Sokolovskaya*. "Stock breeding and Artificial Insemination of Livestock" (*Hutchinsons Scientific & Technical Bulletin, Londres*).

(3) *T. Bonadonna*. — "Le basi scientifiche e le possibilità applicative della fecondazione artificiale negli animali domestici". (Ed. Vannini, Brescia 1937).

(4) *G. W. Salisbury, G. H. Beck, P. T. Cripps, I. Elliott*. — "The effect of the dilution rate on the fertility of bull spermatozoa used for a. i. (*Jour. of Dairy Science* 26, 1057-1069, 1943).

(5) *G. W. Salisbury, I. Elliott, N. L. van Denmark*. — "Further studies of the effect of the dilution rate on the fertility of bull semen used for a. i. (*Jour. of Dairy Science*, 28, 233-341, 1945)

(6) *G. W. Salisbury*. — "The Glycolysis, livability and fertility of bovine spermatozoa as influenced by their concentration. The problem of fertility". (Ed. Earl T. Eagle, Princetown Un. Press, 1946).

(7) *E. L. Willett*. — "Fertility of bull semen diluted from 1:110 to 1:300". (*American Foundation for the study of Genetics*, P. 58).

(8) *G. W. Salisbury, R. W. Bratton*. — "Fertility level of bull semen diluted at 1:400 with and

without sulfanilamide". (*Jr. of Dairy Science* Sep. 1948, Vol. XXXI, N° 9).

(9) *C. B. Knodt, G. W. Salisbury*. — "The effect of sulfanilamide upon the livability and metabolism of bovine spermatozoa". (*Jr. of Dairy Science*, 285-291, 1946).

(10) *G. W. Salisbury, C. G. Knodt*. — "The effect of sulfanilamide in the diluent upon fertility of bull semen". (*Jr. of Dairy Science*, 30, 361-369, 1947).

(11) *R. H. Foote, G. W. Salisbury*. — "The effect of sulfonamides upon the livability of spermatozoa and upon the control of bacteria in diluted bull semen". (*Jr. of Dairy Science*, Sep. 1948, Vol. XXXI, N° 9).

(12) *Id. Id.* — "The effect of pyridin, penicillin, fuorcin and phenoxotol upon the livability of spermatozoa and upon control of bacteria in diluted bull semen". (*Jr. of Dairy Science*, Sep. 1948, Vol. XXXI, N° 9).

(13) *K. Karlshoy, N. N. Rasbeck*. — "Studies on the vitality of spermatozoa and bacterial growth in beaver semen diluted with various diluents". (*Nordisk Veterinaer-medicin*, Sep. 1949).

(14) *E. Dimitropoulos, L. Hennaux, E. Cordiez*. — "L'action des sulfamides sur la vitalité du sperme de taureau". (*C. R. Soc. Biol. Paris*, 141, 1283-1286).

(15) *L. Hennaux, E. Dimitropoulos, E. Cordiez*. — "L'action de la Streptomycine sur la vitalité du sperme de taureau". (*C. R. Soc. Biol. Paris*, 141, 1272-1274).

(16) *J. O. Almquist, P. J. Glantz, W. T. S. Thorp*. — "The effect of Streptomycin upon the

- livability and bacterial content of bovine semen". (Jr. of Dairy Science, 31, 501-507).
- (17) *J. O. Almquist, W. T. S. Thorp, C. B. Knodt.* — "The effect of Penicillin upon the livability, glycolysis and bacterial content of bovine semen". (Journal of Dairy Science, 31, 11-19).
- (18) *C. Romijn.* — "De Invloed van eidocier op het metabolisme van stierensperma". (Tijdschrift voor Dierrenskunde, 1 Fév. 1950).
- (19) *G. W. Salisbury, R. W. Bratton.* — Oeuvre mentionnée.
- (20) *E. Blom.* — "A comparing chamber for microscopic examination of undiluted bull semen". (The Veterinary Journal, Aout 1946).
- (21) D'après la classification de Blom: oeuvre mentionnée.