



FERTILITE DU SPERME D'ETALON CONSERVE 24 A 72H LORS D'UTILISATION D'UNE BOITE DE TRANSPORT JETABLE OU LORS D'OVULATION RETARDEE

Par :

▪ M. Vidament¹, Y. Le Foll¹, C. Rosen¹, J.C. Bayle¹, J.M. Yvon¹,
B. Bruneau¹, A. Margat², L. Wimel², F. Cuir², J.L. Larry³, G.
Arnaud³, C. Marquet¹,

C. Decourt¹, P. Gatesoupe¹, G. Duchamp¹

▪¹ INRA, UR0085, UMR 6175 INRA ; CNRS ; Université Tours ;
Haras Nationaux, PRC, 37 380 Nouzilly, FRA

² Les Haras Nationaux, La Jumenterie, 61 310 Exmes, FRA

³ Les Haras Nationaux, Station expérimentale, Domaine de la
Valade, 19 370 Chamberet, FRA

Résumé

Dans les 3 expérimentations, une dose d'IA était préparée à J0 (200.10⁶ spermatozoïdes totaux, sans air, dans l'INRA 96), conservée soit à température variable dans une boîte de transport jetable en Néopor (Exp 1), soit à 4°C (Exp 2 et 3), puis inséminée avant ovulation (OV) dans l'utérus. Exp 1. Quand la température ambiante autour de la boîte a été Basse (7°C), la température dans la dose dans la boîte est descendue à -1°C à 0°C (à 3 h), puis était de 3°C, 22 h après la récolte. Quand la température ambiante a été Moyenne (17°C) ou Haute (27°C), la température de la dose dans la boîte a varié respectivement de 4°C (à 2 h) à 7°C (à 22 h) et de 8°C (à 2 h) à 10°C (à 22 h). Après 22 h de conservation, la fertilité par cycle a été divisée par deux quand la température était Basse (25%) comparée à celles observées avec les températures Moyenne (53%) et Haute (50%) (4 étalons x 8 cycles x 3 lots, IA-OV : 17 h). La gamme de températures de conservation utilisables pour le sperme conservé 24 h pourrait donc aller de 4 à 10°C à l'intérieur des boîtes. Exp 2. Lorsque l'intervalle IA-OV est court (7 ou 20 h), la fertilité diminue entre 0 et 2 jours, puis entre 2 et 3 jours de conservation (5 étalons x 8 cycles x 5 lots). Exp 3. A intervalle récolte-ovulation constant (68 h), on ne prend pas de risque à garder la dose à 4°C 1 jour de plus et à essayer de s'approcher du moment d'ovulation : fertilité par cycle de 50%, IA à J2, IA-OV 20 h vs 30%, IA à J1, IA-OV 44 h (5 étalons x 8 cycles x 2 lots).

Mots-clés : étalon, fertilité, spermatozoïdes, température, intervalle IA-ovulation

Summary

In the 3 fertility experiments presented here, a single dose of AI was prepared just after collect at Day 0 (200.106 total spermatozoa in INRA96 extender, without air), stored either at variable temperature (Exp 1), or at 4°C (Exp 2 et 3), then inseminated before ovulation (OV) behind the cervix. Exp 1. When the ambient temperature around the disposable container in Neopor for sperm transport (Minitüb) was Low (7°C), the temperature in the AI dose inside the container reached a minimum of -1°C to 0°C at 3 h and was at 3°C, 22 h after collect. When the ambient temperature was Intermediate (17°C) or High (27°C), the temperature in the dose ranged between 4°C (minimum) to 7°C (at 22 h) and from 8°C (minimum) to 10°C (at 22 h), respectively. After 22 h of storage of semen in this container, the per-cycle pregnancy rate was lowered when ambient temperature was Low (25%) compared to those observed when ambient temperature was Intermediate (53%) or High (50%) (4 stallions x 8 cycles x 3 groups, AI-OV : 17 h) (P=0.008). Exp 2. The per-cycle pregnancy rate was decreased when AI was performed at Day 2 (58%, AI-OV 7 h and 45%, AI-OV 20h) compared to Day 0 (68%, no storage, AI-OV 7 h) and was decreased when AI was performed at Day 3 (35%, AI-OV 7 h and 35%, AI-OV 20h) compared to Day 2 (see results above) whatever the time between AI and ovulation (7h or 20 h) (5 stallions x 8 cycles x 5 groups), P= 0.002. Exp 3. The per-cycle pregnancy rate was decreased when AI was performed at Day 1 (30%, AI-OV 44 h) compared to AI at Day 2 (50%, AI-OV 20 h) for the same period of time between collect and OV (68 h) (5 étalons x 8 cycles x 2 lots), P= 0.07.

Key-words: stallion, fertility, sperm, temperature, interval AI and ovulation

Introduction

Bien que des auteurs considèrent que la conservation de la semence d'étalon pendant 24 h permette une fertilité comparable à celle du sperme tout juste récolté ou conservé dans la journée (Aurich, 2005), il est quasiment certain que cela n'est pas le cas pour tous les étalons. Ce qui sera d'autant plus vrai que le temps entre la récolte de sperme de l'étalon et l'ovulation de la jument sera plus long. La température de conservation, et la stratégie d'insémination (nombre de spermatozoïdes par IA, nombre d'IA, intervalle IA-ovulation) sont des éléments importants à prendre en compte pour optimiser la fertilité de la semence conservée.

Le sperme d'étalon peut se conserver à des températures allant de 4 à 20°C, mais cette aptitude est dépendante des dilueurs utilisés et des conditions aérobie/anaérobie (en présence ou en absence d'air) proposées, les résultats sont quelquefois contradictoires. Au laboratoire, les résultats sont souvent prometteurs lorsqu'on mesure la mobilité (voir revue Katila 1997a et Batellier *et al.* 2001b). Dans le dilueur Kenney ou dans le lait, la température de 4°C est toujours satisfaisante, surtout lorsque la conservation est de plus de 24 h. La conservation à 2°C ou moins pendant quelques heures donne des résultats moindres après 24 h de conservation. De 8 à 15°C, les résultats sont souvent très bons. A 20-25°C, les résultats semblent bons sur une période courte (12h à 24 h) mais au-delà, les résultats sont inconstants. Les résultats de fertilités obtenues dans ces différentes conditions (température x dilueur) restent très variables : corrects après 24 h de conservation, plus décevants après 48 h de conservation. Le dilueur INRA96 (IMV, L'Aigle, France) permet, lui, une fertilité tout à fait acceptable après des temps de conservation plus longs (72h), une température de conservation de 15°C (en condition aérobie) ou de 4°C (en condition anaérobie) et quand l'intervalle IA-ovulation est court (moins de 12 h) (Batellier *et al.*, 1997, 2001a, Vidament *et al.* 2005). **Par contre, aucune étude de fertilité n'a été réalisée avec du sperme conservé autour de 8-10°C, avec ce dilueur ou un autre.**

Pour des envois de doses isolées, il est nécessaire d'utiliser un container passif envoyé par les services d'un transporteur. A côté du container passif très performant qu'est l'Equitainer classique (Equitainer II) (prix environ 400 E HT, donc qu'il faut récupérer par un envoi retour), sont apparues sur le marché différentes boîtes jetables d'un prix peu élevé (8 à 10 Euros par boîte). Vu leur moindre inertie thermique, les performances thermiques de ces boîtes sont dépendantes de la température extérieure (Katila *et al.* 1997b, Brinsko *et al.*, 2000). Différentes études menées avec différentes boîtes jetables locales montrent que des écarts de température assez élevés (dans la boîte) par rapport à 4°C ne semblent pas préjudiciables à la mobilité des spermatozoïdes conservés dans le dilueur de Kenney, sauf quand la température est proche de 0 à 1°C ou élevée (plus de 22°C) (Hueck 1990 cité par Katila *et al.* 1997b, McKinnon & Walker 1998 cité par Brinsko *et al.* 2000, Brinsko *et al.*, 2000, Machado *et al.* 2002, Avanzi *et al.* 2006). Alors que ces boîtes sont de plus en plus utilisées, il n'y a pratiquement aucune publication présentant des résultats de fertilité obtenus avec ce genre de boîte.

Avec du sperme conservé 24 h, Batellier *et al.* (1997) ont montré que la fertilité est plus élevée si l'intervalle IA-ovulation est de 24 h ou moins. Quand le sperme est conservé plus longtemps que 24 h, la mobilité et la fertilité du sperme équin diminuent graduellement. Or les juments ont un oestrus long et l'induction d'ovulation (hCG ou agoniste de GnRH ou extraits hypophysaires) n'est efficace que dans ~75% des cas. Par conséquent, pour gérer correctement l'utilisation du sperme conservé, quand l'ovulation est retardée, il est important de savoir si la semence se conserve plus longtemps et dans de meilleures conditions *in vivo* (donc après l'IA, dans la jument) ou *in vitro* (au laboratoire, avec une IA plus tardive dans la jument).

Trois papiers se sont intéressés à ce sujet et les auteurs ont observé différents résultats: résultats similaires pour Shore et al (1998) (1 étalon), meilleurs résultats ou tendance à de meilleurs résultats avec de la semence ayant été conservée plus longtemps au laboratoire (Squires et al., 1998, Vidament et al. 2005). L'importance respective du temps de conservation et de l'intervalle IA-ovulation sur la fertilité doit être déterminée.

Les objectifs des expérimentations présentées ici ont été de 1) mesurer la fertilité de doses d'IA conservées pendant un temps court dans un modèle de boîte jetable mise à différentes températures ambiantes, 2) analyser les effets respectifs du temps de conservation et de l'intervalle IA-ovulation sur la fertilité. Le travail présenté ici (3 expérimentations) complète les résultats présentés à la JRE 2005 (Vidament et al. 2005).

Nos hypothèses ont été que :

- 1) le sperme d'étalon conservé 24 h devait pouvoir supporter des températures relativement variables surtout au-dessus de 4°C et que peut-être la gamme de températures utilisables allait de 4 à 15°C en conditions anaérobies
- 2) la fertilité du sperme conservé 48 h ou plus pourrait être au moins aussi bonne que celle du sperme inséminé plus tôt dans des juments, à temps égal entre récolte et ovulation.

1. Présentation des trois expérimentations

La première expérimentation évalue l'effet des conditions de conservation, et plus précisément l'effet de la température variable obtenue dans une boîte jetable de transport mise à différentes températures ambiantes. Les deux expérimentations suivantes explorent les conditions optimales de mise en place de la semence lorsqu'on reçoit du sperme conservé et que la jument ovule 50 h ou beaucoup plus après la récolte.

Dans ces 3 expérimentations, on a appelé J0 le jour de la récolte et de la préparation de la dose de sperme. Dans tous les cas, la dose d'IA était constituée de 200 millions de spermatozoïdes totaux dilués dans 10 ml de milieu INRA96, conditionné en seringue de 20 ml en conditions anaérobies. Ce nombre de spermatozoïdes était sans doute minimaliste dans une dose d'IA de sperme conservé au-delà de 12 h de conservation, ce qui devait permettre de mieux mettre en évidence des différences éventuelles de fertilité.

La dose était mise telle quelle dans une boîte de transport soumise à des températures variables (Exp 1) ou a été entourée de mousse isotherme et conservée à 4°C (Exp 2 et 3). Après une durée variable de conservation, la dose était inséminée avant ovulation, juste derrière le col de l'utérus, à raison d'1 seule IA par cycle.

L'ovulation était induite quand les femelles présentaient des signes d'oestrus visibles par échographie et qu'elles avaient un follicule en croissance de diamètre suffisant (33 mm pour les ponettes et 35 mm pour les juments). Il a été utilisé des produits à effet LH, entraînant l'ovulation en moyenne 36 h après l'induction : hCG ou extraits hypophysaires équins.

Tous les cycles qui ne correspondaient pas aux conditions strictes d'intervalle entre IA et moment d'ovulation prévues dans les différents protocoles (voir détails dans les paragraphes suivants) ont été éliminés.

Les résultats de fertilité ont été exprimés en fertilité par cycle qui est le rapport entre le nombre de cycles ayant entraîné une gestation et le nombre de cycles totaux

inséminés. Des mesures ont été réalisées sur le sperme conservé des étalons dans les 3 expérimentations. Elles ne seront pas présentées ici (faute de place) sauf dans l'expérimentation 1 qui est la seule expérimentation dont les lots diffèrent par la préparation de la semence.

Statistiques et choix du degré de signification :

Les différences entre les résultats de fertilité (pourcentages) ont été analysées avec une procédure pour données catégorielles prenant en compte l'effet lot et l'effet étalon (proc CATMOD, SAS, USA). Cette procédure n'est valide que s'il n'y a pas d'interaction lot * étalon, ce qui a été le cas dans les expérimentations 1 et 2. En cas d'interaction (expérimentation 3), les données ont été analysées classiquement par un χ^2 . Le niveau de signification choisi a été de $P < 0,1$, seuil de signification préconisé par Amann (2005) pour les expérimentations de fertilité sur les équins.

Les données de mobilité du sperme ont été analysées par une analyse de variance prenant en compte les effets étalon, lot et leur interaction (proc GLM, SAS). Le seuil de signification choisi a été $P < 0,05$.

2. Effet de la température ambiante sur la température et la fertilité des doses conservées dans une boîte jetable (Expérimentation 1)

Quelle est la courbe de température (descendante puis remontante) dans le type de boîte de transport choisi en fonction de la température ambiante ? Est-ce que cette température ambiante peut avoir un effet sur la fertilité et les caractéristiques séminales des doses conservées dans ces boîtes ?

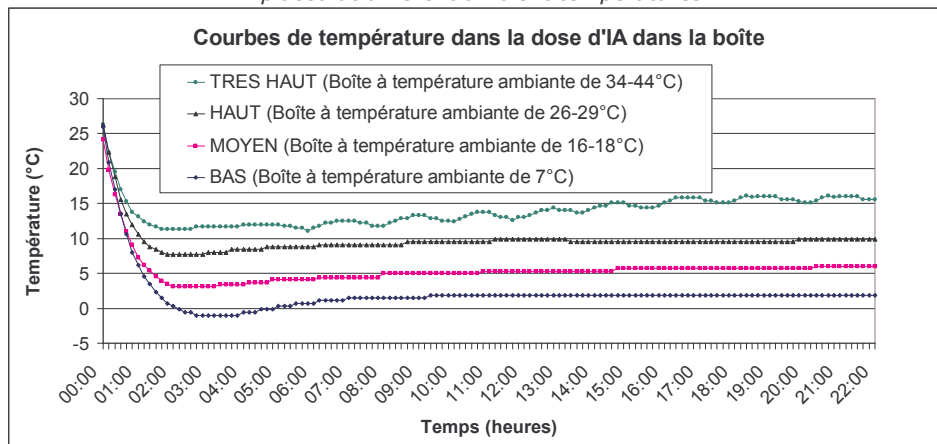
a – Matériel et méthodes

La boîte de transport de semence Néopor Minitüb (Equiland, Ecausseville, France) a été choisie pour ce protocole, car, suite à des essais antérieurs, elle semblait avoir d'assez bonnes qualités thermiques. La boîte est fournie, à l'achat avec 2 seringues, 2 glass-packs et 1 carton d'emballage. A chaque fois, la boîte était préparée avec 2 seringues contenant chacune 10 ml de sperme tout juste dilué à 37°C et 2 glass-packs congelés à -18°C. L'emballage carton était mis en place.

Quatre températures ambiantes ont été choisies afin d'obtenir dans la boîte des températures variées. Les étuves utilisées pour contrôler la température ambiante étaient réglées à 0,5°C près, sauf l'étuve utilisée pour le lot Très Haut qui était une grosse étuve antique, chauffant 1 fois toutes les 2 heures, avec une amplitude de 10°C entre la température minimale et la température maximale ! Les étuves pouvaient contenir 1 (2 étuves) à 4 boîtes (2 étuves) en même temps. Les températures subies par la semence (température minimale, temps pour l'obtenir, température au bout de 22 h) sont rapportées dans le graphique I et dans le Tableau 1 en fonction de la température ambiante utilisée. Pour le lot Très Haut, la température minimale dans la dose a été de 10,5 à 12,5°C obtenue en 2 h, et la température après 22 h de conservation était de 14 à 16°C.

Le temps de conservation choisi a été court (22 h) car 1) à certaines températures ambiantes élevées, la température interne était contrôlée peu de temps par la boîte et 2) cela permettait de remplir les étuves avec les boîtes une fois par jour.

Figure I : Courbes de température dans la dose d'IA dans la boîte de transport soumise à différentes températures ambiantes
 Figure I: Temperature curves in the sperm dose located in the container placed at different ambient temperatures



Dans les lots Bas, Moyen et Haut, les étuves étaient régulées à 0,5°C près, contrairement à la vieille étuve utilisée pour le lot Très Haut (10°C d'écart entre mini et maxi suite à «un coup de chauffe »toutes les 2 h).

En juin et juillet 2007, des ponettes de l'INRA de Nouzilly ont été inséminées de manière standard 17 h avant ovulation avec une dose conservée pendant 22 h dans 3 des lots décrits plus haut (Bas, Moyen, Haut). Quatre étalons ont été utilisés. Huit cycles par étalon et par lot ont été réalisés. Les doses faites avec un même éjaculat étaient réparties dans des boîtes à 2 températures ambiantes différentes (2 étuves disponibles à ce moment-là): par exemple, 1^{er} jour : Haut, Moyen, 2^e jour : Bas, Moyen, 3^e jour : Bas, Haut etc....

Le mois suivant, des mesures sur la semence des mêmes étalons conservée 22 h dans l'INRA96 dans les mêmes conditions ont été effectuées, sur des éjaculats partagés entre les 4 lots (4 étalons x 2 éjaculats x 4 lots) :

- Caractéristiques de mobilité avec un analyseur assisté par ordinateur (CASA) (HTM-IVOS, version 10.9, Hamilton Thorn Research, Beverly, MA, USA)

- Evaluation de l'intégrité de l'acrosome avec et sans induction de la réaction acrosomique avec l'ionophore A23187 : les spermatozoïdes ont été incubés avec ou sans ionophore pendant 2 h à 37°C. Puis les acrosomes des spermatozoïdes ont été colorés avec la sonde Pisum Sativum Agglutinin couplée au colorant fluorescent FITC afin de détecter au microscope à fluorescence l'état des acrosomes : soit intact, soit présentant une réaction acrosomique ou soit autre/abimé. Après calcul du % de réactions acrosomiques dans les tubes témoin (spontanées) et dans les tubes avec le ionophore, on a pu calculé la différence de % de réactions acrosomiques (DRA), afin de quantifier les réponses uniquement dûes à la présence de ionophore.

- Test hypo-osmotique (HOS) : les spermatozoïdes ont été mis 15 min à 37°C dans un milieu hypotonique de pression osmotique faible (50 mOsm = Hank's Hepes sans NaCl), alors que la pression osmotique du sperme est de 300 mOsm. Les spermatozoïdes dont la membrane est fonctionnelle cherchent à rééquilibrer la concentration en sels en absorbant de l'eau au niveau du flagelle donc en « gonflant ». Les % de spermatozoïdes très gonflés (réponse très marquée) et gonflés (toutes les réponses) ont été calculés.

b - Résultats

* Fertilité dans les 3 lots testés

La fertilité par cycle a été divisée par deux quand la température ambiante était Basse comparée à celles observées avec la température Moyenne et Haute (P=0,002) (Tableau 1).

Tableau 1 : Fertilité par cycle pour les trois températures de conservation testées
 Table 1: Per-cycle pregnancy rate in the different groups in experiment 1

Lot	BAS	MOYEN	HAUT	Total 3 lots
Température ambiante à laquelle la boîte était mise	7°C («7»)	16-18°C («17»)	26-29°C («27»)	
Température minimale de la semence atteinte en	- 1 à 0°C en 3 h	3 - 5,5°C en 2 h 30	7 - 8,5°C en 2 h 10	
Température de la semence à 22 h après la récolte	2,3 - 3,3°C	6 - 8°C	9 - 11°C	
MW420	2/8 (25%)	1/8 (13%)	2/8 (25%)	5/24 ^{***} (21%)
MW233	2/8 (25%)	6/8 (75%)	4/8 (50%)	12/24 (50%)
MW329	1/8 (13%)	5/8 (63%)	6/8 (75%)	12/24 (50%)
MW438	3/8 (38%)	5/8 (63%)	4/8 (50%)	12/24 (50%)
TOTAL	8/32 ^{***} (25%)	17/32 (53%)	16/32 (50%)	

***: En ligne, différence significative avec l'estimation du % moyen de tous les lots (41%), P<0,002

§§§: En colonne, différence significative avec l'estimation du % moyen de tous les étalons (41%), P<0,002

* Caractéristiques des spermatozoïdes dans les 4 lots

Mobilité. Le % de spermatozoïdes rapides (ayant une vitesse lissée (VAP) supérieure à 30 µm/sec) a été plus élevé dans les lots Haut (84%) et Très Haut (82%), comparé au lot Bas (78%), le lot Moyen étant intermédiaire (81%). Il n'a pas été observé d'effet lot sur la rectitude de la trajectoire (STR), ni sur le % de spermatozoïdes progressifs (% progressifs = % spermatozoïdes dont la VAP est supérieure à 30 µm/sec et dont la rectitude de trajectoire (STR) est supérieure à 80%). En revanche, la vitesse de base VCL (Velocity Curvilinear) et l'amplitude latérale de la tête (ALH) ont présenté des valeurs plus élevées dans le lot Bas (199 µm/sec et 8,5 µm), par rapport au lot Haut (180 et 7,6) et Très Haut (183 et 7,7), tendance que l'on retrouve sur la vitesse lissée VAP, sans que cela soit significatif

Mesures sur les acrosomes. Dans les tubes témoins, le % de spermatozoïdes à acrosome intact a été plus faible dans le lot Bas (65%) par rapport aux 3 autres lots (77 à 80%), ce qui provient en partie d'un % plus élevé de spermatozoïdes présentant des réactions acrosomiques spontanées (22% vs 13 à 16%). Le % de spermatozoïdes présentant une réaction acrosomique après ionophore a été similaire entre les lots, même si on observe une tendance à un % moins élevé dans les lots Bas et Moyen. La DRA a été plus faible dans le lot Bas (53%), par rapport aux lots Haut (68%) et Très Haut (69%).

Test HOS. L'intégrité de la membrane mesurée par le test HOS a été identique dans les 4 lots que l'on considère le % de spermatozoïdes gonflés ou le % de spermatozoïdes très gonflés.

3. Stratégie d'IA avec du sperme conservé à 4°C quand la jument ovule 50 h ou plus après la récolte

3.1. En cas d'intervalles IA-ovulation relativement courts (Expérimentation 2)

Dans cette expérimentation, nous avons étudié l'effet de l'intervalle IA-ovulation (2 intervalles testés mais inférieurs à 24 h) conjugué à l'effet temps de conservation (2 temps de conservation longs) afin de vérifier si les bons résultats de fertilité obtenus

dans notre laboratoire après 72 h de conservation dans l'INRA 96 étaient bien reproductibles dans des conditions plus robustes et sur plus d'étalons.

La fertilité du sperme conservé à 4°C dans l'INRA96 a donc été mesurée en comparant :

- 2 temps de conservation : 48 h vs 72 h
- 2 intervalles IA-ovulation : 7 h vs 20 h

La fertilité obtenue avec du sperme utilisé immédiatement et inséminé 7 h avant ovulation (= fertilité de référence) a été mesurée également pour quantifier la perte de fertilité due à ces différentes pratiques.

a - Matériel et Méthodes

Pendant la monte 2005, le sperme de 5 étalons (2 à la station expérimentale de Chamberet (Allegro et Florian), 1 à la jumenterie du Pin (Secret) et 2 à Nouzilly (MW329 et MW233)) a été récolté, conditionné, conservé et inséminé localement suivant 5 lots (voir Tableau 2).

Huit cycles par lot et par étalon ont été utilisés.

b - Résultats

La fertilité par cycle par lot, globale et par étalon, est indiquée dans le Tableau 2. Globalement la fertilité a été diminuée significativement entre 0 et 48 h, et entre 48 et 72 h. Il n'a pas été observé de différence significative entre les intervalles IA-ovulation testés après 48 ou 72 h de conservation.

Tableau 2: Fertilité par cycle suivant les différents lots de l'expérimentation 2
Table 2: *Per-cycle pregnancy rate in the different groups in experiment 2*

	Lot 1	Lot 2	Lot 3	Lot 4	Lot 5
Temps conservation spz	0 h	48 h	42 h	72 h	66 h
Température conservation	/	4°C	4°C	4°C	4°C
Intervalle IA-ovulation	7 h	7 h	20 h	7 h	20 h
Intervalle récolte-ovulation	7 h	55 h	62 h	79 h	86 h
Etalon Secret	3 / 8 (38%)	1 / 8 (13%)	1 / 8 (13%)	0 / 8 (0%)	1 / 8 (13%)
Etalon MW233	6 / 8 (75%)	4 / 8 (50%)	4 / 8 (50%)	4 / 8 (50%)	2 / 8 (25%)
Etalon Allegro	8 / 8 (100%)	6 / 8 (75%)	6 / 8 (75%)	3 / 8 (38%)	3 / 8 (38%)
Etalon Florian	6 / 8 (75%)	5 / 8 (63%)	3 / 8 (38%)	4 / 8 (50%)	3 / 8 (38%)
Etalon MW329	5 / 8 (63%)	7 / 8 (88%)	4 / 8 (50%)	3 / 8 (38%)	5 / 8 (63%)
Fertilité par cycle 5 étalons	28 / 40*** (70%)	23 / 40 (58%)	18 / 40 (45%)	14 / 40*** (35%)	14 / 40* (35%)
Fertilité par cycle par temps de conservation	70%	51%		35%	
Fertilité par cycle 4 étalons (sans l'étalon Secret)	78%	69%	53%	44%	41%

***: En ligne, différence significative avec l'estimation du % moyen de tous les lots (49%), * P<0,05 *** P<0,001

Les lots 4 et 5 ont un résultat global identique mais des résultats différents par étalon ce qui entraîne une estimation du % moyen du lot 4 de 34% et du lot 5 de 37% dans l'analyse CATMOD où l'effet étalon est pris en compte, ce qui explique la différence de significativité de ces 2 lots par rapport au % moyen de tous les lots.

3.2. En cas d'intervalle IA-ovulation de plus de 24 h (Expérimentation 3)

Dans un centre de mise en place où les doses sont reçues les lundis, mercredis, vendredis, comment gérer au mieux le travail du week-end? Si une seule dose est disponible (produite par exemple le vendredi), qu'on la reçoive à J1 (le samedi) et que la jument ovule à J3 (le lundi), vaut-il mieux avoir inséminé la jument avec du

sperme à J1 (sperme conservé 24 h à 4°C puis dans la jument) ou avec du sperme à J2 (sperme conservé 48 h à 4°C puis dans la jument) ?

Dans l'expérimentation suivante, nous avons mesuré la fertilité du sperme conservé à 4°C dans l'INRA96 suivant 2 lots qui représentaient un effet combiné du temps de conservation et de l'intervalle IA-ovulation quand l'ovulation avait lieu environ 72 h après la récolte du sperme.

a - Matériel et Méthodes

En juillet 2006, des ponettes de l'INRA de Nouzilly ont été échographiées tous les matins quand elles présentaient un follicule de taille suffisante et des signes d'oestrus au niveau de l'utérus. Du sperme de 5 poneys de Nouzilly était récolté à J0 à 10 h. La moitié des ponettes était inséminée à J1 à 10 heures et l'autre moitié était inséminée à J2 à 10 heures. Dans les 2 lots, l'induction d'ovulation était réalisée à 18 h à J1 afin que les juments ovulent théoriquement à 06 h du matin à J3. A J2, les ponettes étaient également échographiées l'après-midi, pour éliminer celles qui avaient ovulé spontanément depuis le matin.

b - Résultats

Les résultats de fertilité par cycle sont dans le Tableau 3. La procédure CATMOD a montré une forte interaction lot*étalon dû à l'étalon MW233 aux résultats très contrastés entre les 2 lots. Les données ont donc été analysées par un Xhi2 simple. La fertilité a été significativement plus élevée dans le lot 48-20 où les juments ont été inséminées avec du sperme conservé plus longtemps à 4°C, mais avec un intervalle IA-ovulation plus court que dans le lot 24-44 ($P=0,06$). La différence est surtout due à l'étalon MW233. Sans cet étalon, la fertilité des 2 lots est de 12/32 (38%) dans le lot 24-44 et de 14/32 (44%) dans le lot 48-20.

Tableau 3 : Fertilité par cycle suivant les différents lots de l'expérimentation 3
Table 3: Per-cycle pregnancy rate in the different groups in experiment 3

	Lot 24-44	Lot 48-20	Total
Temps conservation spz	24 h	48 h	
Température conservation	4°C	4°C	
Intervalle IA-ovulation	44 h	20 h	
Intervalle récolte-ovulation	68 h	68 h	
Alt	2 / 8 (25%)	2 / 8 (25%)	4 / 16 (25%)
MW233	0 / 8 (0%)	6 / 8 (75%)	6 / 16 (38%)
MW329	2 / 8 (25%)	4 / 8 (50%)	6 / 16 (38%)
MW438	4 / 8 (50%)	2 / 8 (25%)	6 / 16 (38%)
MW210	4 / 8 (50%)	6 / 8 (75%)	10 / 16 (63%)
Total	12 / 40 (30%) ^B	20 / 40 (50%) ^A	

^{A B} : En ligne, les valeurs portant ces lettres en exposant sont différentes significativement au seuil de $P=0,06$.

4. Discussion

Préambule : toutes les expérimentations présentées ici sont des expérimentations avec mesure de la fertilité. Du fait du caractère de « tout ou rien » de la réponse, il est difficile de mettre des différences en évidence sans avoir des effectifs de quelques centaines de cycles dans chaque lot. Nos conclusions sont donc à prendre avec précautions, notamment quand les différences trouvées sont non significatives (Amann 2005). Malgré tout, la cohérence des résultats entre expérience (résultats qui

se répètent ou se complètent dans le même laboratoire ou dans des laboratoires différents) permet de tirer les conclusions les plus vraisemblables.....

Dans l'expérimentation 1, pendant le temps de conservation d'une journée (22 h), le sperme d'étalon a très bien supporté des températures très différentes, du moment qu'elles étaient de 3°C ou au-dessus. La fertilité a été la même dans les lots Moyen et Haut et beaucoup plus basse dans le lot Bas. Les caractéristiques des spermatozoïdes ont été très proches dans les lots Moyen, Haut et Très Haut. Ceci est cohérent avec 1) les observations de différents auteurs suggérant que les spermatozoïdes d'étalon peuvent se conserver à des températures relativement variées au moins pendant 24 h (cf introduction) et 2) que les températures très basses sont néfastes (Katila 1997a, Magistrini *et al.* 1992, Moran *et al.* 1992). Alors que la fertilité a été très nettement diminuée dans le lot Bas, il est à noter que même si la plupart des caractéristiques séminales ont été différentes significativement dans le lot Bas par rapport aux autres lots, ces caractéristiques séminales du lot Bas n'ont pas été franchement très différentes des autres lots, cette variation peut donc échapper très facilement à un contrôle de routine. **En conclusion, en conditions anaérobies, la gamme de températures de conservation optimales à l'intérieur des boîtes va certainement de 3 à 11°C (voire jusqu'à 16°C), ceci pour le sperme conservé 24 h. Ces résultats donnent une plus grande souplesse pour le stockage et le transport de la semence équine.**

Les températures d'ambiance testées ont été de 7 à 37°C, avec des effets néfastes de la température de 7°C. Les températures en France pendant la saison de monte peuvent être extrêmement contrastées (de 0 à 20°C dans la même journée, mais la température peut être beaucoup plus élevée dans un véhicule au soleil). Mc Kinnon & Walker 1998 (cité par Brinsko *et al.* 2000) dans un essai avec différentes boîtes jetables à différentes températures : 4°C, 20°C et 50°C (dans une voiture au soleil) ont montré qu'aucune de ces boîtes ne pouvait maintenir une température correcte interne par 50°C de température ambiante. Par temps froid (7°C), on peut suggérer de ne mettre qu'un glass pack congelé au lieu de 2, ou de mettre les 2 glass-packs à 4°C, ce qui serait plus prudent. Malgré les inconvénients sanitaires évidents liés à l'utilisation d'une température de conservation plus élevée, en cas de doute sur les températures ambiantes où sont mis les colis quand on confie la boîte à un transporteur (en fait, on ne les connaît jamais), **il vaut mieux que le sperme ait un peu plus chaud (entre 4 et 10°C) qu'un peu trop froid (< 4°C).**

Dans l'expérimentation 2, l'effet du temps de conservation a été plus influent que l'effet de l'intervalle IA-ovulation sur le résultat de fertilité, mais les deux temps IA-ovulation testés étaient relativement courts (≤ 20 h) et l'essai manquait de puissance, pour mettre en évidence des différences peu élevées, comme indiqué plus haut. L'étalon Secret a présenté une fertilité très faible, dès 0 h. Ses résultats font baisser la moyenne de chaque lot, mais ne modifie pas l'interprétation des résultats. Sans cet étalon, la fertilité des 2 lots 48 h a été de plus de 50% et des 2 lots 72 h a été de plus de 40% (Tableau 2). Pour les 5 étalons, la fertilité après 48 h de conservation a été d'une valeur égale à 75% de celle de la fertilité de référence (immédiate). Ce pourcentage a été de 52% pour la fertilité obtenue après 72 h de conservation. Ces pourcentages sont pratiquement identiques si on les calcule sans l'étalon Secret. L'étalon Secret a présenté dans la semence, pendant la période d'insémination, des cellules rondes à noyau excentré d'environ 10 μm de diamètre, détectées lors d'examen morphologiques (10-15 pour 100 spermatozoïdes), Ces cellules étaient très certainement des spermatides rondes. Secret a sans doute eu une atteinte temporaire de la spermatogénèse, au moment du protocole. En effet, huit mois après, cet étalon n'avait plus que 2% de ces cellules rondes dans la semence. Dans les autres expérimentations de fertilité faites dans notre laboratoire avec du sperme conservé 72 h dans l'INRA 96, on avait observé des fertilités par cycle de 48% (n=52) (2 étalons) associée à un intervalle IA-ovulation de 7 à 12h

(température 15°C en anaérobie) (Batellier *et al.* 1997, 2001b) et de 60% (n=80) (température 4°C en anaérobie ou de 15°C en aérobie) associé à un intervalle IA-ovulation de 6-8 h même si cela recouvrait des niveaux de fertilité très différents entre les 5 étalons (Vidament *et al.* 2005). **Ceci confirme que le dilueur INRA 96 maintient bien le pouvoir fécondant des spermatozoïdes pendant 48 à 72 h.**

Lorsque l'intervalle IA-Ovulation est court (≤ 20 h), la fertilité diminue lorsque le temps de conservation augmente, ce qui était prévisible. Il était intéressant de mesurer la fertilité obtenue avec un intervalle IA-ovulation beaucoup plus long associé à un temps de conservation plus court. Dans l'expérimentation 3, un stockage supplémentaire au laboratoire s'est révélé au moins aussi efficace sur les résultats de fertilité qu'un stockage plus long dans la jument, à intervalle récolte-ovulation constant. Parmi les 5 étalons, 3 montrent une fertilité certainement améliorée, dont 1 de manière spectaculaire. Des résultats contradictoires sont retrouvés dans la littérature scientifique à ce sujet: Shore *et al.* (1998) ont trouvé une fertilité semblable pour 1 étalon dont le sperme était utilisé avec 1 dose inséminée 2 jours de suite ou avec 2 doses inséminées ensemble 2 jours avant ovulation. Squires *et al.* (1998), en utilisant le même protocole mais avec 3 étalons, observent une fertilité plus élevée avec le 1er traitement qu'avec le second. Des 3 étalons, deux tendaient à avoir une fertilité améliorée et le 3ème non. Vidament *et al.* (2005), en utilisant le même protocole avec 3 étalons, observent une fertilité qui tend à être plus élevée avec le 1er traitement qu'avec le second. On peut donc faire l'hypothèse qu'il y aurait 2 populations d'étalons : une (dans notre cas, 3/12 étalons sur les 4 expérimentations (25%) des étalons) dont le sperme se stocke bien dans le tractus génital de la jument et une autre (75% des étalons) dont le sperme se stocke mal. **Ainsi pour la majorité des étalons, il semble préférable de stocker plus longtemps la semence à 4°C que d'inséminer la jument longtemps avant ovulation. Pour une minorité d'étalons, cela ne semble pas avoir d'importance.**

Pour Squires *et al.* (1998), le refroidissement et la conservation entraînent sans doute une dégradation des membranes des spermatozoïdes qui, alors, n'ont pas les mêmes capacités à se fixer longtemps aux cellules épithéliales de l'isthme de l'oviducte, zone de stockage des spermatozoïdes. Et le fait d'inséminer à un moment plus proche de l'ovulation ou de réinséminer augmente alors la fertilité. Ce résultat est important pour l'industrie équine, surtout si on reçoit 2 doses de sperme lors d'un envoi : on peut faire 1 IA dès la réception en induisant l'ovulation de la jument puis suivant l'état de la jument le lendemain (proche ou non de l'ovulation), on prend la décision de réinséminer ou d'attendre. **On ne prend pas de risque à garder une dose supplémentaire à 4°C et à essayer de s'approcher le plus possible du moment d'ovulation.**

Après conservation pendant 48 à 72 h, les étalons présentent une large gamme de niveau de fertilité. Ceci est perceptible dans les 6 expérimentations présentées par notre laboratoire (JRE 05 et JRE 09), ce qu'on retrouve aussi dans les expérimentations de Squires *et al.* 1998 et de Shore *et al.* 1998. **Dans tous les cas, nous confirmons que le niveau de fertilité attendu sera très dépendant de l'étalon utilisé, beaucoup plus qu'avec du sperme utilisé immédiatement ou conservé peu de temps.**

Remerciements

Pour leurs précieux conseils : M. Magistrini (Exp 1, 2 et 3) et E. Blesbois (Exp 1). Y. Gaude, le personnel de la jumenterie de l'INRA de Nouzilly, celui de la jumenterie du Pin et celui de la station expérimentale de Chamberet, ainsi que D. Joulia, S. Barbey, J. Schneider et A. Jelodin pour la manipulation des animaux, M. Ottogalli pour la préparation des extraits hypophysaires.

G. Delhomme (IMV, L'Aigle, France) et X. Druart pour l'aide matérielle
 Y. Le Foll était étudiant de l'Ecole Vétérinaire d'Alfort, J.C. Bayle et C. Rosen étudiants de l'Ecole Vétérinaire de Nantes.
 C. Decourt était étudiante en maîtrise de biologie à l'université de Tours
 C. Marquet et P. Gatesoupe étaient étudiantes en BTS Productions Animales respectivement au lycée agricole de St Cyran le Jambot et au lycée agricole de Fondettes.

Financements

Ces travaux ont été financés par les Haras Nationaux (notamment par des financements attribués par le Conseil d'Orientation Scientifique et Technique) et par l'INRA.

Bibliographie

AMANN RP. Weakness in reports of « fertility » for horses and other species. *Theriogenology* 2005, 63: 698-715.

AVANZI B.R., FARRÁS M.C., MELO C.M., ALVARENGA M.A., DELL'AQUA JR J.A., MEDEIROS A.S.L., ARAÚJO G.H.M., PAPA F.O. Efficiency of different cooling and storage systems for maintaining equine semen viability in a hot environment. *Animal Reproduction Science*, 2006, 94: 152.

BATELLIER F., DUCHAMP G., YVON JM., VIDAMENT M., ARNAUD G., MOUYSET C., VINCENT P., PALMER E., MAGISTRINI M. Mise au point d'un dilueur chimiquement défini pour l'insémination artificielle immédiate ou différée. In : 23^{ème} journée d'étude de la recherche équine. 26 février 1997. Paris, 97- 105.

BATELLIER F., VIDAMENT M., DUCHAMP G., YVON JM., ARNAUD G., JOURDAIN JP. MAGISTRINI M. L'INRA96, un milieu de conservation de la semence d'étalon aux températures de 4 et 15°C. 2001a. In : 27^{ème} journée d'étude de la recherche équine. 7 mars 2001. Paris, 15-21.

BATELLIER F., VIDAMENT M., FAUQUANT J., DUCHAMP G., ARNAUD G., YVON JM., MAGISTRINI M. 2001b. Advances in cooled semen technologies. *Anim. Reprod. Science* 2001b, 68 :181-190.

BRINSKO SP, ROWAN KR, VARNER DD, BLANCHARD TL. (2000) Effects of transport container and ambient storage temperature on motion characteristics of equine spermatozoa. *Theriogenology*. 53 (8) 1641-55.

KATILA T. (1997a) Procedures for handling fresh stallion semen. *Theriogenology*. 48 (7) 1217-27.

KATILA T, COMBES GB, VARNER DD, BLANCHARD TL. (1997b) Comparaison of three containers used for the transport of cooled stallion semen. *Theriogenology*. 48 (7) 1085-92.

MACHADO M.S., LEO K.M., GOMES G.M., MEDEIROS L.P., ALVARENGA M.A. Efeitos de diferentes sisternas de transporte obre a qualidade do semen refrigerado equino (Effects of differents transport systems on equine cooled semen quality). *Revista Brasileira de Reproducao Animal*, 2002, 26: 194-196.

MAGISTRINI M., COUTY I., PALMER E. Interactions between sperm packaging, gas environment, temperature and diluent on fresh stallion sperm survival. *Acta Vet. Scand.* 1992 Suppl. 88, 97-110.

MORAN DM, JASKO DJ, SQUIRES EL, AMANN RP. (1992) Determination of temperature and cooling rate which induce cold shock in stallion spermatozoa. *Theriogenology*. 38 (6) 999-1012.

NUNES, D.B. ET AL. (2007) Efficiency of short-term storage of equine semen in a simple-design cooling system. *Anim. Reprod. Sci.* doi:10.1016/j.anireprosci.2007.06.022

SHORE MD, MACPHERSON ML, COMBES GB, VARNER DD, BLANCHARD TL. (1998) Fertility comparison between breeding at 24 hours or at 24 and 48 hours after collection with cooled equine semen. *Theriogenology*. 50 (5) 693-8.

SQUIRES EL, BRUBAKER JK, MCCUE PM, PICKETT BW. (1998) Effect of number and frequency of insemination on fertility of mares inseminated with cooled semen. *Theriogenology*. 49 : 743-749.

VIDAMENT M. ET AL. (2005) Fertilité du sperme d'étalon conservé de 24 à 72 h dans l'INRA96® : stratégie d'insémination et température de conservation. 31^{ème} Journée de la recherche équine, Paris : 93-103.