



Mise au point d'un dilueur chimiquement défini pour l'insémination artificielle immédiate ou différée

F. BATELLIER, G. DUCHAMP, J.M. YVON,
M. VIDAMENT, G. ARNAUD, C. MOUYSSSET, P. VINCENT,
E. PALMER ET M. MAGISTRINI.
INRA-Haras nationaux, PRMD, 37380 Nouzilly
Institut du cheval DEFI Chamberet / Jumenterie du Pin

Résumé

Le lait est le dilueur le plus utilisé pour le sperme d'étalon en vue de l'insémination artificielle. Notre objectif a été la mise au point d'un dilueur chimiquement défini, à base de composants du lait efficaces, et optimisé pour la conservation du sperme d'étalon. Après fractionnement, l'effet de toutes les fractions du lait a été testé *in vitro* et la concentration des composants efficaces a été optimisée. Le dilueur ainsi obtenu (INRA 96) a été testé *in vivo* dans quatre expériences de fertilité, utilisant du sperme conservé 24 heures avant insémination et dans une expérience utilisant du sperme conservé 72 heures. Utilisé à 15°C, ce dilueur permet une amélioration par rapport à la conservation à 4°C, en particulier pour les étalons dont la semence est sensible au "cold shock".

Mots-clés : cheval - insémination artificielle - dilueurs - fertilité

Summary

Milk is the most general diluent of equine semen used for artificial insemination. The aim of the study was to elaborate a diluent chemically defined, composed of efficient milk components and optimised for sperm survival. After fractionation, each milk fraction has been tested *in vitro* on sperm cell motility and the concentration of the efficient fractions were optimised. The diluent INRA 96 composed of the best efficient fraction has been tested in fertility trials : 4 after 24 hours storage before insemination, 1 after 72 hours storage before insemination. When used at 15°C, INRA 96 improved sperm fertility compared to reference diluents at 4°C and seems to be an alternative to stallions sensitive to cold shock.

Key-words : horse - artificial insemination - diluents - fertility

INTRODUCTION

Sitôt après la récolte, le sperme d'étalon doit être dilué dans un milieu permettant sa conservation. Le lait et les dilueurs à base de lait : tels que l'INRA 82 (Palmer, 1984) ou le dilueur de Kenney (Kenney et al, 1975) sont actuellement les plus utilisés pour la semence d'étalon en vue d'inséminations artificielles immédiates ou différées (Clay et al, 1984 ; Douglas-Hamilton et al, 1984 ; Varner et al, 1989). La mise au point d'un nouveau dilueur sous-entend la recherche de ses conditions optimales d'utilisation : température et conditionnement. En effet, il n'existe sans doute pas une température optimale de conservation du sperme d'étalon, mais plutôt différents dilueurs adaptés à différentes températures. Les expériences visant à rechercher cet optimum sont nombreuses et les résultats divergent. Les températures de 4 à 7°C et 15 à 20°C ont été testées (Palmer, 1984 ; Province et al, 1985). Les expériences de fertilité utilisant des doses conservées aux différentes températures donnent également des résultats très divergents : Varner et al (1989) utilisent le dilueur de Kenney et n'observent aucune différence entre 5°C et 20°C ; Squires et al (1988) utilisent le même dilueur et concluent à une meilleure conservation à 5°C mais uniquement pour certains étalons. Les durées possibles de conservation sont difficiles à déterminer, certains auteurs (Douglas-Hamilton et al, 1984) utilisent avec succès les doses 6 heures à 24 heures après la récolte. Squires et al (1988) n'obtiennent par contre aucune gestation après conservation de la semence pendant 48 heures à 20°C. Une étude plus récente (Heiskanen et al, 1994) utilisant du sperme conservé 70 et 80 heures à 5°C dans le dilueur de Kenney supplémenté en théophylline (10 mM) et Hepes (10 mM), donne des résultats de 77% et 57% de fertilité par cycle.

Le lait présente plusieurs qualités du "dilueur idéal", c'est un milieu tamponné qui contient des éléments potentiellement protecteurs des spermatozoïdes (lipides, protéines et lactose) (Alais, 1984). Néanmoins, ces éléments protecteurs ne sont peut être pas présents aux concentrations optimales et il est possible que des fractions néfastes y soient présentes (Garcia et Graham, 1987). Notre travail a donc pour but la mise au point d'un dilueur chimiquement défini et optimisé, à base de constituants du lait. Après les essais *in vitro* d'optimisation de l'utilisation de notre dilueur, nous avons évalué son efficacité par des expériences de fertilité utilisant du sperme conservé 24 heures ou 72 heures.

MATERIELS ET METHODES

1. Fractionnement du lait

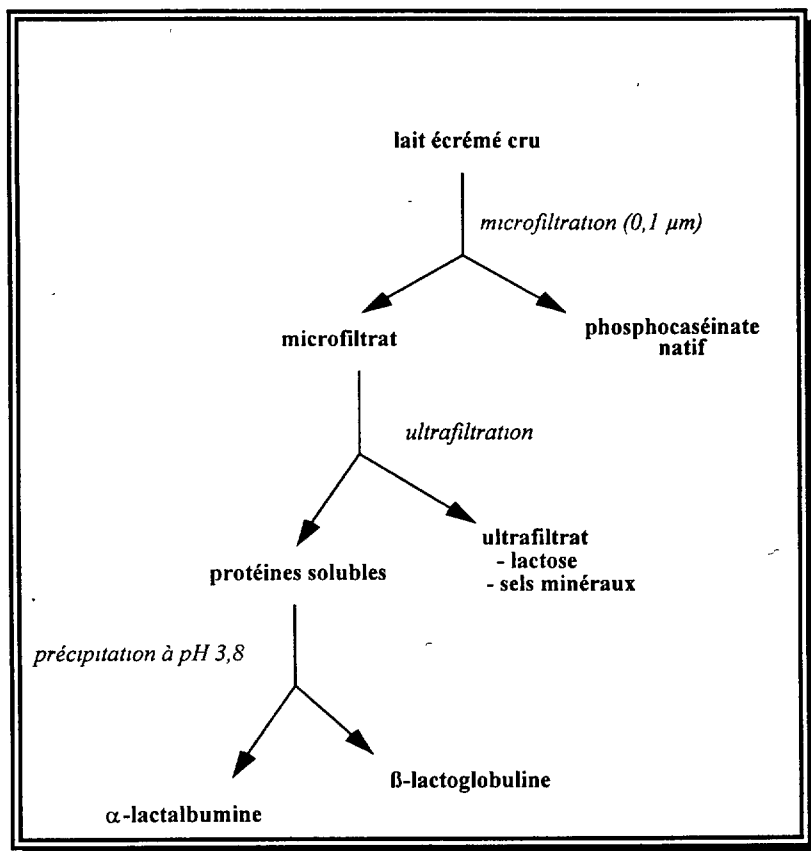
Le fractionnement des composants du lait (Figure I) a été réalisé dans l'unité de Technologie laitière de l'INRA de Rennes, dirigée par M. Maubois. La microfiltration du lait écrémé cru (Pierre et al, 1992) permet de séparer le microfiltrat (ou petit lait) du phosphocaseinate natif (caséines sous la forme micellaire qu'elles ont dans le lait). L'ultrafiltration du microfiltrat permet de séparer les protéines solubles (essentiellement β -lactoglobuline et α -lactalbumine) de l'ultrafiltrat (lactose et sels minéraux).

2. Effet des différentes fractions du lait sur la mobilité des spermatozoïdes *in vitro*

Les différentes fractions ont été testées en supplémentation du dilueur de base composé de lactose (126 mM), de glucose (67 mM) et de sels de Hank's (noté HGLL) (Magistrini et al, 1992). Chaque composant a été comparé aux témoins classiquement utilisés : HGLL additionné de 1% de BSA (Bovine Serum Albumine, Sigma A7906), lait UHT du commerce et INRA 82 (Palmer, 1984). Dix étalons ont été utilisés au total, avec un minimum de 6 étalons (1 éjaculat par étalon) pour chaque composant du lait à tester. Après la récolte, le sperme filtré sur de la gaze est dilué dans les différents milieux à tester, puis stocké en conditions aérobies à 15°C ou à 37°C (0,5 ml de sperme dilué dans des tubes de 5 ml), ou anaérobies à 4°C (5 ml de sperme dilué dans des tubes de 5 ml). Les durées de conservation ont varié entre 6 et 96 heures, en fonction de la température et de la qualité des dilueurs

Figure I : Fractionnement des composants du lait

Figure I : Fractionation of milk components



utilisés, afin que les observations soient réalisées à un moment où les dilueurs puissent être discriminés. Avant l'analyse, les échantillons sont réchauffés 10 minutes à 37°C. La qualité de la conservation du sperme est évaluée par analyse automatisée de la mobilité des spermatozoïdes (Hamilton Thorn Motility Analyser, Hamilton Thorn Research, Danvers, MA, USA), en retenant comme critère le pourcentage de spermatozoïdes rapides, c'est à dire ayant une vitesse supérieure à 30 μm/sec.

3. Expériences de fertilité

3.1. Sperme conservé pendant 24 heures

Quatre expériences utilisant du sperme conservé 24 heures ont été réalisées : à Nouzilly en 1994, à Chamberet en 1995 et en 1996 et à la jumenterie du Pin en 1996. Dans chacune de ces 4 expériences nous avons comparé deux conditions de conservation du sperme :

- dans l'INRA 82 ou le dilueur de Kenney à 4°C, en conditions anaérobies dans des seringues de 20 ml ne contenant que 10 ml de sperme dilué (piston tiré à moitié).
- dans notre dilueur optimisé à base de fractions du lait : INRA 96, à 15°C en conditions aérobie dans des seringues de 20 ml contenant 10 ml de sperme dilué et 10 ml d'air (piston tiré complètement).

Les races des étalons, leur nombre, le nombre de cycles ont varié selon les lieux d'expérimentation. Les conditions expérimentales sont résumées dans le tableau 1.

Tableau 1 : Conditions des expériences de fertilité utilisant des doses conservées 24 heures

Table 1 : Experimental conditions for the fertility trial with semen stored during 24 hours

	Nouzilly 1994	Chamberet 1995	Chamberet 1996	Le Pin 1996
animaux animals	pones pony stallions	chevaux de selle et lourds light and draft horses		chevaux de selle light horses
nombre d'étalons number of stallion	2	3	4	4
nombre de cycles number of cycles	84	90	125	62
dilueur 4°C 4°C diluent	INRA 82	dilueur de Kenney	dilueur de Kenney	dilueur de Kenney
dilueur 15°C 15°C diluent	INRA 96			

Les ponettes et les juments ont été échographiées chaque jour à partir du premier jour des chaleurs et réparties au hasard dans les 2 lots. A Nouzilly, les ponettes ont été inséminées une première fois quand le follicule dominant a atteint 33 mm, l'ovulation a été induite 24 heures après par une injection iv de 25 mg de C.E.G (crude equine gonadotrophin ou extrait hypophysaire équin total) et une seconde insémination a été réalisée 48 heures après la première, si l'ovulation n'était pas survenue. A Chamberet et à la jumenterie du Pin, les conditions ont été plus proches des conditions d'élevage : les juments ont été inséminées à partir du jour où le follicule dominant a atteint 33 mm, toutes les 48 heures jusqu'à ovulation.

3.2. Sperme conservé pendant 72 heures

Une expérience utilisant du sperme conservé 72 heures avant insémination a été réalisée à Nouzilly en 1996. Toutes les doses ont été préparées dans l'INRA 96 et ont été utilisées soit pour insémination immédiate, soit après conservation à 15°C avec agitation constante.

Les ponettes ont été échographiées chaque jour à partir du premier jour des chaleurs et réparties au hasard dans les 2 lots. Cent deux cycles de ponettes ont été utilisés au total. Dans la première partie de l'expérience, toutes les ponettes ont été inséminées une seule fois, environ 7 heures avant l'ovulation induite par une injection iv de 25 mg de C.E.G. Dans la seconde partie, les ponettes du lot "inséminations différées" ont été inséminées 2 fois : la première fois environ 12 heures avant l'ovulation induite et la seconde fois environ 4 heures après l'ovulation.

RESULTATS

1. Effet des différentes fractions du lait sur la mobilité des spermatozoïdes *in vitro*

Le tableau 2 présente des exemples de résultats obtenus après conservation dans les dilueurs à base de composants du lait. Les concentrations de phosphocasinat natif et de β -lactoglobuline ont été optimisées (Batellier et al, 1994) (ici ne sont présentés que les résultats obtenus avec les concentrations optimales : 27 et 40 g/L respectivement). A 15°C, après 96 heures de conservation, le

pourcentage de spermatozoïdes rapides le plus élevé a été obtenu dans le dilueur HGLL + 27 g/L de phosphocaséinate natif. Par contre à 4°C, ce dilueur permet d'obtenir des résultats identiques à ceux obtenus dans le lait et inférieurs à ceux obtenus dans l'INRA 82. La β -lactoglobuline permet d'obtenir des résultats significativement supérieurs à ceux obtenus avec la BSA à 4°C, par contre à 15°C ces 2 protéines apportent une protection identique. L' α -lactalbumine et l'ultrafiltrat sont 2 fractions toxiques pour les spermatozoïdes.

Tableau 2 : Pourcentage de spermatozoïdes rapides ($v > 30 \mu\text{m/sec}$) après conservation dans des dilueurs à base des composants du lait.

Table 2 : Percentage of rapid spermatozoa ($v > 30 \mu\text{m/sec}$) after incubation in diluents containing milk components.

Fractions de lait testées / Milk components tested	HGLL + phosphocaséinate natif native phosphocaseinate (27 g/L)		HGLL + β -lactoglobuline β -lactoglobulin (40 g/L)		HGLL + α -lactalbumine α -lactalbumin (1,2 g/L)	ultrafiltrat ultrafiltrate + BSA (10 g/L)
	4°C 96h	15°C 96h	4°C 48h	15°C 48h	37°C 6h	15°C 48h
témoins/references						
HGLL+10 g/L BSA	31% *	43% *	52% *	35% ns	24% *	13% *
lait UHT/UHT milk	8% ns	16% *	18%	40%	51%	43%
INRA 82	31% *	43% *	52% *	35% *		
	47%	21%	63%	58%		

* : $p < 0,05$

2. Expériences de fertilité après conservation du sperme pendant 24 heures

Le tableau 3 regroupe les résultats des 4 expériences réalisées avec du sperme conservé pendant 24 heures. Dans chaque expérience les doses conservées à 15°C ont permis d'obtenir une fertilité par cycle supérieure à celle obtenue avec les doses conservées à 4°C, cette tendance n'a été statistiquement significative que dans l'expérience de Nouzilly en 1994. Par contre, le regroupement des 4 expériences nous a permis de mettre en évidence une différence statistiquement significative ($p < 0,001$) en faveur du stockage à 15°C.

Les tableaux 4 et 5 regroupent les résultats des 4 expériences cumulées quant à l'influence de l'intervalle entre la dernière insémination et l'ovulation (Tableau 4) et à l'influence du nombre d'inséminations sur la fertilité (Tableau 5). Les pourcentages de fertilité par cycle obtenus lors d'inséminations situées à moins de 24 heures de l'ovulation sont supérieurs à ceux obtenus lors d'inséminations situées entre 24 et 48 heures de l'ovulation, et ce pour les 2 techniques de conservation. L'amélioration apportée par la conservation à 15°C est significative pour les cycles dont l'intervalle entre la dernière insémination et l'ovulation est inférieur à 24 heures. L'amélioration

significative de la fertilité lorsque l'on augmente le nombre d'inséminations n'a été constatée que pour les doses conservées à 4°C. L'amélioration apportée par la conservation à 15°C est significative lorsqu'une seule insémination a été effectuée.

Tableau 3 : Fertilité par cycle (%) après insémination artificielle avec du sperme conservé pendant 24 heures.

Table 3 : Fertility per cycle after artificial insemination with semen stored 24 hours.

	Nouzilly 1994	Chamberet 1995	Chamberet 1996	Le Pin 1996	total
4°C	36% n=41	39% n=44	34% n=64	58% n=31	41% n=171
	p<0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p<0,001
15°C	60% n=43	50% n=46	47% n=61	87% n=31	57% n=176

Tableau 4 : Fertilité par cycle (%) après insémination artificielle avec du sperme conservé pendant 24 heures, influence de l'intervalle "dernière IA - ovulation"

Table 4 : Fertility per cycle after artificial insemination with semen stored 24 hours, influence of the interval "last AI - ovulation"

	4°C	15°C	total
<24 h	44% n=100	64% n=121	55% n=221
	p>0,05	p<0,001	p<0,002
24 à 48 h	36% n=71	42% n=55	39% n=126
	p>0,05	p<0,007	p<0,002

Tableau 5 : Fertilité par cycle (%) après insémination artificielle avec du sperme conservé pendant 24 heures, influence du nombre d'inséminations.

Table 5 : Fertility per cycle after artificial insemination with semen stored 24 hours, influence of the number of inseminations.

	4°C	15°C	total
1 IA	26% n=43	52% n=46	39% n=89
	p<0,02	p<0,02	p>0,05
> 1 IA	46% n=128	58% n=130	48% n=278
	p=0,06	p>0,05	p>0,05

3. Expérience de fertilité après conservation du sperme pendant 72 heures

Les résultats obtenus pendant les 2 parties de l'expérience ont été identiques. On n'a donc pas observé d'effet du nombre d'inséminations et pas d'effet d'une seconde insémination post-ovulation très proche du moment de l'ovulation (Tableau 6). Les pourcentages de fertilité par cycle ont été de 48% obtenus après inséminations différées de 72 heures vs 68% obtenus après inséminations immédiates. Cette différence est significative (p<0,001).

Tableau 6 : Fertilité par cycle (%) après insémination artificielle avec du sperme conservé pendant 72 heures.

Table 6 : Fertility per cycle after artificial insemination with semen stored 72 hours.

	IA immédiate immediate AI	IA 72 heures AI after 72 hours
première partie first part	65% n=17	50% n=20
seconde partie second part	70% n=33	47% n=32
total	68% n=50	48% n=52

Statistical significance values (p-values) are indicated in boxes between the cells:

- Between first part and second part for immediate AI: $p > 0,05$
- Between first part and second part for AI after 72 hours: $p > 0,05$
- Between first part and second part for total: $p > 0,05$
- Between total immediate AI and total AI after 72 hours: $p < 0,001$

DISCUSSION

Schématiquement, on peut considérer que le lait contient 3 catégories de substances : celles qui sont très toxiques et ne permettent aucune survie des spermatozoïdes, comme l'ultrafiltrat ou l' α -lactalbumine (Batellier et al, 1996), celles qui permettent d'obtenir des survies analogues à celles déjà obtenues dans d'autres dilueurs et celles qui permettent une amélioration significative en matière de conservation des spermatozoïdes. L'impossibilité de conserver les spermatozoïdes dans le lait à 15°C peut s'expliquer par la toxicité de la fraction ultrafiltrat. En effet, le maintien du métabolisme des spermatozoïdes à cette température les rend plus sensibles aux éléments toxiques métabolisables. Au contraire, à 4°C, le métabolisme des spermatozoïdes est diminué ce qui permet une économie de leurs réserves énergétiques et une bonne conservation de leur mobilité qui est restaurée après réchauffement ; par contre, des altérations membranaires, appelées "cold shock", se produisent, et entraînent pour certains individus une baisse du pouvoir fécondant des spermatozoïdes.

La fraction de lait riche en phosphocéinate natif a permis la mise au point du dilueur INRA 96. Ce dilueur est le premier milieu de conservation permettant des survies de qualité à 15°C.

Les résultats obtenus *in vitro* nous ont incité à comparer le pouvoir fécondant des spermatozoïdes conservés dans les 2 types de conditions. L'optimisation des conditions de stockage des spermatozoïdes aux différentes températures (Magistrini et al, 1992), explique pourquoi nous avons comparé un ensemble de conditions différentes : 15°C sous-entend le dilueur INRA 96 et des conditions aérobies, alors que 4°C sous-entend les dilueurs INRA 82 ou de Kenney et des conditions anaérobies.

In vivo, les résultats obtenus après conservation à 15°C ont été dans tous les cas supérieurs aux résultats après conservation à 4°C, ce qui nous a conduit à faire des essais de conservation pendant une plus longue période. La différence entre les inséminations immédiates et les inséminations différées de 72 heures est significative, néanmoins 48% de fertilité par cycle représentent un résultat très encourageant. Il est très difficile de comparer ce résultat à ceux obtenus par d'autres équipes, les protocoles expérimentaux et le mode d'évaluation de la fertilité étant toujours très différents. Seuls les résultats de Heiskanen et al (1994) ont montré que la fertilité peut être maintenue (65% par cycle de diagnostics positifs de gestation à 30 jours, sur 40 cycles) après une période longue de conservation (70 à 80 heures à 5-7°C).

Il faut maintenant poursuivre les essais sur un plus grand nombre d'étalons et dans les conditions d'élevage. Les applications de ce travail sont multiples : le transport de doses sur de plus longues distances (la mise au point des systèmes d'expédition à la température constante de 15°C est en cours), la gestion des étalons, qui mènent une carrière sportive parallèle et sont souvent absents des lieux de récolte pendant quelques jours. De plus, il est possible qu'en conservant le sperme à une température de 15°C, les effets néfastes du cold-shock soient évités. Il est important de vérifier cette hypothèse qui pourrait permettre d'inscrire dans des programmes de conservation de semence des étalons dont le sperme ne supporte pas les températures de 4°C ou la congélation.

BIBLIOGRAPHIE

- ALAIS C. 1984 - Science du lait, principes des technologies laitières, 4ème édition, Editions SEPAIC, 814 p.
- BATELLIER F., MAGISTRINI M., FAUQUANT J., PALMER E. 1994 - Supplémentation d'un dilueur de conservation du sperme d'étalon par des protéines du lait purifiées. Biol. of the cell. (82), n°1, Abstract D4.
- BATELLIER F., GERARD N., MAGALLON T., MAUBOIS J.L., PALMER E., MAGISTRINI M. 1996 - Multimeres of α -lactalbumin are toxic for equine spermatozoa. Biol. of the cell (sous presse).
- CLAY C.M., SLADE N.P., AMANN R.P., SQUIRES E.L. 1984 - Effects of extender, storage temperature and centrifugation on stallion spermatozoal motility and fertility. In: Proc. 10th Int. Congress on Anim Reprod and AI Urbana Champaign IL USA. (2) 186.
- DOUGLAS-HAMILTON D.H., OSOL R., OSOL G., DRISCOLL D., NOBLE H. 1984 - A field study of the fertility of transported equine semen. Theriogenology (22) 291-304.
- GARCIA M.A., GRAHAM E.F. 1987 - Dialysis of bovine semen and its effect on fresh and freeze-thawed spermatozoa. Cryobiology (24) 446-454.
- HEISKANEN M.L., HUHTINEN M., PIRHONEN A., MÄENPÄÄ P.H. 1994 - Insemination results with slow-cooled stallion semen stored for 70 or 80 h. Theriogenology (42) 1043-1051.
- KENNEY R.M., BERGMAN R.V., COOPER W.L., MORSE G.W. 1975 - Minimal contamination techniques for breeding mares: techniques and preliminary findings. In : Proc. 21st Am Assoc Equine Pract 327-336.
- MAGISTRINI M., COUTY I., PALMER E. 1992 - Interaction between sperm packaging, gas environment, temperature and diluent on fresh stallion sperm survival. Acta vet. scand. (88) (suppl) 97-110.
- PALMER E. 1984 - Factors affecting stallion semen survival and fertility. In : Proc. 10th Int Congress on Anim Reprod and AI Urbana-Champaign, IL USA. (3) 377.
- PIERRE A., FAUQUANT J., LE GRAET Y., PIOT M., MAUBOIS J.L. 1992 - Préparation de phosphocaséinate natif par microfiltration sur membrane. Lait (72) 461-474.
- PROVINCE C.A., SQUIRES E.L., PICKETT B.W., AMANN R.P. 1985 - Cooling rates, storage temperatures and fertility of extended equine spermatozoa. Theriogenology (23) 925-934.

SQUIRES E.L., AMANN R.P., MC KINNON A.O., PICKETT B.W. 1988 - Fertility of equine spermatozoa cooled to 5 or 20°C. In : Proc 11th Int Congress on Amim Reprod and AI Dublin, Ireland (3) 297.

VARNER D.D., BLANCHARD T.L., MEYERS P.J., MEYERS S.A.1989 - Fertilizing capacity of equine spermatozoa stored for 24 h at 5 or 20°C. Theriogenology. (32) 515-525.

