



3 mars 2004

LES HARAS NATIONAUX

EFFET DU SITE DE L'INSEMINATION ET DU NOMBRE DE SPERMATOZOÏDES SUR LA FERTILITE DE L'ETALON

- DUCHAMP G¹, DOLIGEZ P², BERSINGER F²
 LARRY J.L.³, BARRY P³, YVON JM¹, BRUNEAU B¹, VIDAMENT M¹, MAGISTRINI M¹, CLEMENT F²
¹ U.M.R. I.N.R.A.-C.N.R.S. – Université François Rabelais – Les Haras nationaux -PRC 37380 Nouzilly
² HARAS NATIONAUX, Direction du développement La Jumenterie- 61310 Exmes
³ HARAS NATIONAUX, Direction du développement, 19370 Chamberet

Résumé

L'insémination profonde avec un nombre réduit de spermatozoïdes fait l'objet de nombreux essais. Une revue bibliographique présente ces différentes techniques (IA en haut de corne, guidée par voie rectale, ou échoguidée, ou par endoscopie) et leurs résultats chez les équins.

D'autre part, deux expérimentations ont été réalisées afin de comparer 2 sites d'IA : dans le corps de l'utérus, juste derrière le col (UTERUS) ou en haut de la corne, du côté du follicule préovulatoire, guidée par palpation rectale (CORNE). Dans l'expérience I, la fertilité par cycle a été la même que le sperme congelé de 2 étalons ait été inséminé (400×10^6 spz totaux par IA) dans l'UTERUS (63% (17/27)) ou en haut de CORNE (59% (16/27)). Dans l'expérience II, le sperme frais de 3 étalons a été inséminé immédiatement après la récolte soit à la dose de 200×10^6 spz dans 10 ml de dilueur (200), soit à la dose de 50×10^6 spz totaux dans 0,5 ml de dilueur (50). La fertilité par cycle a été la même avec 200 dans l'UTERUS (73% (22/30)), 50 dans l'UTERUS (70% (21/30)) ou 50 en haut de CORNE (67% (20/30)). Il n'y a pas eu de différence significative entre les lots dans chaque expérience. L'effet du site d'insémination n'a donc pas été mis en évidence.

Mots-clés : équin, insémination profonde, spermatozoïdes, faible nombre de spermatozoïdes, fertilité

Summary

This paper reviews the results of the deep uterine low-dose insemination techniques in the equine species and presents two experimental studies. These studies were carried out to compare 2 sites of insemination on the fertility per cycle: in the uterine body closed to the cervix (UT), and at the top of the horn ipsilateral to the preovulatory follicle by a rectally-guided approach (TOP). In the experiment I, 54 saddle mares were inseminated with frozen semen from two stallions, with 400×10^6 of total spermatozoa per AI. The fertility per cycle was respectively 63% (17/27) (UT) vs 59% (16/27) (TOP). In the experiment II, 90 welsh pony mares were inseminated with fresh semen from 3 stallions, either with 200×10^6 of total spz diluted in 10 ml of extender (200) or with 50×10^6 of total spz diluted in 0.5 ml of extender (50). Fertility per cycle was respectively 73% (22/30) in group A (200 in UT), 70% (21/30) in group B (50 in UT) and 67% (20/30) in group C (50 at TOP). Within each experiment, there was no significant difference between the sites of insemination. In the experiment II, the sperm number and the inseminated volume did not influence the fertility rate.

Key-words : equine, deep insemination, spermatozoa, low-dose insemination, fertility

PREAMBULE

Dans cet article, nous utiliserons les termes suivants :

DG : diagnostic de gestation	PGE : prostaglandines E
GnRH : Gonadotrophin Releasing Hormon	PMS : spermatozoïdes progressifs mobiles
IA : insémination artificielle	Pré OV : avant l'ovulation,
IAC : insémination artificielle en semence congelée	Post OV : après ovulation
IAF : insémination artificielle en semence fraîche	RE : résorption embryonnaire
IAR : insémination artificielle en semence réfrigérée	Spz : spermatozoïdes
OV : ovulation	

I- INTRODUCTION

De nouvelles techniques d'insémination se développent dans le but d'améliorer la productivité des étalons, c'est-à-dire multiplier le nombre de doses par éjaculat. Parmi ces techniques, l'insémination profonde en haut de la corne guidée par voie rectale ou par endoscopie d'un nombre réduit de spermatozoïdes fait l'objet de nombreuses expérimentations en recherche équine.

*Techniques d'insémination traditionnelles

La technique classique d'insémination chez la jument consiste à introduire la semence de l'étalon par l'intermédiaire d'un cathéter poussé au travers du col jusqu'au corps de l'utérus.

Selon les recommandations des équipes américaines (SQUIRES et al, 2000), les juments sont inséminées avec 500 millions de spermatozoïdes mobiles progressifs (PMS) en semence fraîche, 1 milliard de spermatozoïdes totaux en semence réfrigérée 24 h et entre 800 millions et 1 milliard de spermatozoïdes en semence congelée.

En France, la technique recommandée en sperme frais et pratiquée couramment dans Les Haras nationaux utilise des doses de 200.10^6 spermatozoïdes totaux utilisés immédiatement ou dans la journée, puisqu'il a été montré que 200.10^6 spermatozoïdes totaux étaient équivalant à 400.10^6 spermatozoïdes totaux sur des étalons de trait (ROUSSET et al., 1986) ou des étalons de sang (VIDAMENT et al., 2000). La fertilité par cycle moyenne est alors de 50 à 56%, alors que la fertilité en monte en main est de 55 à 60% (Résultats Les Haras Nationaux 1999 à 2003). En sperme congelé, la technique recommandée et pratiquée dans les Haras nationaux utilise des doses de 400.10^6 spermatozoïdes totaux par IA sur les juments de sang puisqu'il a été montré que le passage de 200 à 400.10^6 spermatozoïdes totaux par IA entraîne un gain de fertilité d'au moins 10 points (VIDAMENT et al, 1998). La fertilité par cycle en sperme congelé est, dans ces conditions, de 45 à 49% (Résultats Les Haras Nationaux 1999 à 2003).

Le nombre de doses d'insémination par jument et donc le nombre de juments pouvant être servies dépend fortement de la disponibilité de l'étalon d'une part, et de sa capacité à produire des spermatozoïdes en quantité et en qualité suffisantes.

*Limites techniques et économiques de la production de sperme

Il semble nécessaire d'avoir un grand nombre de spermatozoïdes pour maintenir un taux de fertilité acceptable (MORRIS et ALLEN, 2002). Cependant, dans un certain nombre de cas, il peut être intéressant de réduire le nombre de spermatozoïdes par jument lors de l'IA :

a) *Limitation de la production de spermatozoïdes*

Un certain nombre d'étalons dits subfertiles ont une qualité de semence qui semble être mise en cause. Aussi, d'autres étalons produisent un nombre de spermatozoïdes insuffisant (oligospermie).

Parallèlement à cela, l'utilisation de la semence congelée a suivi un essor important ces dernières années, notamment dans le but d'exploiter :

- les étalons qui poursuivent une carrière de compétition tout en ayant un grand nombre de juments à servir,
- le transport et l'exportation des doses,
- les étalons morts mais à potentiel génétique intéressant.

En moyenne un éjaculat contient 100 à 120 paillettes de 50.10^6 spermatozoïdes totaux, soit 13 doses d'IA de 400.10^6 spermatozoïdes. Il est réservé 6 doses d'IA par jument et par saison dans les Haras Nationaux (INSTITUT DU CHEVAL, 1996). Compte tenu de la faible disponibilité d'un étalon poursuivant une carrière sportive, la période de congélation de la semence est restreinte. De plus, certains étalons produisent une semence qui supporte mal la congélation, donc leur production est limitée à quelques bons éjaculats. Enfin, la production de paillettes en grand nombre pour le propriétaire de l'étalon représente un investissement important. C'est pourquoi, la gestion des stocks de paillettes et le suivi des juments doivent être optimisés.

b) Sélection des spermatozoïdes en laboratoire

Dans le but de valoriser au mieux les éjaculats des étalons à haut potentiel génétique, de nouveaux traitements des spermatozoïdes sont en développement :

- sélection des meilleurs spermatozoïdes (mobilité – viabilité) d'un éjaculat,
- sexage des spermatozoïdes.

Ces traitements ont recours à des technologies plus ou moins poussées de laboratoire comme :

- le gradient de PERCOLL (NIE et al, 2003 ; LEO et al, 2001 ; MORRIS et al, 2000 ; CARNEVALE et al, 2001 ; ALVARENGA et LEO, 2002)
- le cytomètre de flux (BUCHANAN et al, 2000 ; LINDSEY et al, 2002b).

c) Limitation des réactions inflammatoires chez la jument lors de l'IA

L'inflammation utérine post-saillie est une réaction physiologique normale chez la jument qui se résorbe généralement dans les 24 heures (LINDSEY et al, 2001). Cependant, chez certaines juments âgées, l'endométrite post-saillie peut être plus sévère et associée à une accumulation de liquide dans l'utérus (TROEDSSON, 1999). Une des possibilités de réduire cette réaction inflammatoire serait de déposer les spermatozoïdes directement sur la papille uterotubaire afin de limiter leur altération au cours de leur trajet dans l'utérus (réactions phagocytaires) (LINDSEY et al, 2001).

***Les techniques d'IA profonde**

L'insémination profonde a été testée sur le mouton (depuis 1970), le porc (1999) et en humaine (1990). Elle a permis l'obtention de gestation chez les équins suite à un dépôt proche de l'oviducte (MORRIS et ALLEN, 2002).

Depuis quelques années, cette technique est expérimentée sur la jument selon des modalités différentes :

- **L'IA guidée par voie rectale** : le cathéter d'insémination est introduit par le col de l'utérus et ensuite guidé manuellement par voie rectale afin d'amener l'extrémité du cathéter au plus haut de la corne ipsilatérale à l'ovaire contenant le follicule pré-ovulatoire.
- **L'IA échoguidée par voie rectale** : le procédé est sensiblement le même, mais la localisation de l'extrémité du cathéter est contrôlée par échographie rectale.
- **L'IA sous endoscopie** : l'endoscope est guidé au travers de l'utérus en passant par le col et introduit dans la corne jusqu'à visualisation de la papille uterotubaire sur laquelle sera déposée la semence via une cannule introduite dans le conduit de l'endoscope. La progression de l'endoscope est facilitée par injection d'air filtré.
- **L'IA dans l'oviducte par laparotomie** : utilisée chez la femme (BERGER, 1987), chez la brebis (MAXWELL, 1993), l'insémination dans l'oviducte consiste à introduire un cathéter par le pavillon de l'oviducte par laparotomie (animal tranquilisé avec incision sur le flanc et extériorisation de l'ovaire et de la corne).

Depuis 1998, plusieurs équipes ont expérimenté ces différentes techniques chez la jument. Les principaux résultats de ces travaux sont synthétisés, par technique, dans les tableaux ci-dessous.

Tableau 1 : Techniques d'insémination dans le corps de l'utérus
Uterine body insemination

N°	Auteur – année	Type de préparation de la semence	Moment IA	Fertilité/cycle
IAF				
1	Mac Cue et al, 1998	IAF 500.10 ⁶ PMS (20 ml)	24-28 h post hCG	40 % (6/15)
2	Squires et al, 2000 (Exp 1)	IAF 500.10 ⁶ PMS (20 ml)	34-40 h post GnRH	90 % (18/20)
10	Leao et al, 2002	IAF 400. 10 ⁶ PMS IAF 10.10 ⁶ PMS	Toutes les 48 h si taille folliculaire ≥ 35mm	50 % (6/12) 17 % (2/12)
IAR				
6	Peterson et al, 2002	IAF-IAR 500.10 ⁶ PMS x 2	12 et 24 h post hCG	37 % (4/11)
IAC				
3	Dell'Aqua et al, 2001	IAC 50.10 ⁶ (1 paillette 0,25 ml) IAC 150.10 ⁶ x 2 (2 x 1 paillette 0,5 ml) IAC 400.10 ⁶ x 2 (2 x 1 paillette 0,5 ml) IAC 800.10 ⁶ (1 paillette)	Pré ov Pré + post ov Pré + post ov Post ov	20 % (2/10) 50 % (5/10) 50 % (5/10) 30 % (3/10)
4	Morris et Allen, 2001 -Exp 1	IAC 5.10 ⁶ PMS (100 µl)	30-32 post hCG	25 % (2/8)
5	Alvarenga et Leao, 2002	IAC 400.10 ⁶ PMS	0-8 h post OV	0% (0/12)
7	Squires et al, 2002	IAC 200.10 ⁶ x 2 (2 x 1 paillette de 0.5ml)	24 + 40 h post hCG	50 % (10/20)
11	Morris et al, 2003	IAC 14.10 ⁶ PMS (0,5 ml) IAC 3.10 ⁶ PMS (0,1 ml par endoscopie)	32h post hCG 32h post hCG	67% (8/12) 14 % (2/14)

Dans tous les tableaux, les lignes portant le même numéro sont issues de la même étude

Tableau 2 : Techniques d'IA profonde guidée par voie rectale
Rectally guided uterine horn insemination

N°	Auteur – année	Type de préparation de la semence	Moment IA	Fertilité/cycle
IAF				
9	Lindsey et al, 2002 (b)	IAF 20.10 ⁶ triés sexés à 5°C (300 µl)	30 h post hCG	38 % (9/24)
12	Nie et al, 2003	IAF 25.10 ⁶ (0,5 ml) IAF 25.10 ⁶ (0,5 ml) Sephadex IAF 25.10 ⁶ (0,5 ml) Percoll	24 h post hCG 24 h post hCG 24 h post hCG	33 % (10/30) 50 % (15/30) 43 % (13/30)
IAR				
8	Brinsko et al, 2003	IAR 5.10 ⁶ total (200 µl)	24 h post hCG	56 % (10 /18)
IAC				
3	Dell'Aqua et al, 2001	IAC 50.10 ⁶ (1 paillette 0,25 ml) IAC 150.10 ⁶ x 2 (2 x1 paillette 0,5 ml)	Pré-ov. Pré + post ov.	0 % (0/10) 40 % (4/10)
6	Peterson et al, 2002	IAC 50.10 ⁶ PMS x 2 (2 x 1 paillette 0,5 ml)	12-36 h post hCG	64 % - (7/11)
7	Squires et al, 2002	IAC 200.10 ⁶ x 2 (2 x 1 paillette 0,5 ml)	24-40 h post hCG	20 % (4/20)

Dans tous les tableaux, les lignes portant le même numéro sont issues de la même étude

Tableau 3 : Techniques IA profonde sous contrôle échographique
Ultrasonography guided uterine horn insemination

N°	Auteur – année	Type de préparation de la semence	Moment IA	Fertilité/cycle
IAF				
2	Squires et al, 2000			
	Expé 1	IAF 25.10 ⁶ PMS – 1 ml IAF 5.10 ⁶ PMS – 1 ml IAF 5.10 ⁶ PMS – 0.2 ml	34-40h post GnRH 34-40h post GnRH 34-40h post GnRH	57 % (12/21) 30 % (3/10) 40% (4/10)
	Expé 2	IAF sexé 25.10 ⁶ PMS – 1 ml IAF sexé 25.10 ⁶ PMS – 1 ml + 4 % jaune d'œuf	34h post GnRH 34h post GnRH	30 % (3/10) 50 % (5/10)
	Expé 3	IAF 5.10 ⁶ totaux – 100 µl	Induction quand IA	0 % (0/10)

Dans tous les tableaux, les lignes portant le même numéro sont issues de la même étude

Tableau 4 : IA profonde sous endoscopie
Hysteroscopic deep insemination

N°	Auteur – année	Type de préparation de la semence	Moment IA	Fertilité/cycle	Commentaires
IAF					
13	Manning et al, 1998	IAF 1.10 ⁶ PMS (160 µl) IAF 10.10 ⁶ PMS (250 µl)		22 % (2/9) 0 % (0/10)	Directement dans cannule utéro-tubaire
14	Vasquez et al, 1998	IAF 3,8.10 ⁶ PMS (20 µl)		30 % (3/10)	6 juments à endomérite suite à l'IA
11	Morris et al, 2000	IAFsélectionné par Percoll (30-150µl) 10.10 ⁶ PMS 5.10 ⁶ PMS 1.10 ⁶ PMS 0,5.10 ⁶ PMS 0,01.10 ⁶ PMS 0,001.10 ⁶ PMS	Induction quand IA ou max 8 h avant	60 % (6/10) 75 % (6/8) 64 % (16/25) 29 % (4/14) 22 % (2/11) 10 % (1/10)	
9	Lindsey et al, 2002 (b)	IAF 5°C 20 10 ⁶ triés sexés (300 µl) IAF 15°C 20 10 ⁶ triés sexés (300 µl)	30 h post hCG 30 h post hCG	55 % (12/22) 72 % (18/25)	Juments tranquillisées
10	Leao et al, 2002	IAF 10 10 ⁶ PMS	Toutes les 48 h post 35mm	42 % (5/12)	
IAF - IAR - IAC					
2	Squires et al, 2000 Expé 3 Squires et al, 2000 et Lindsey et al, 2002 c Expé 4	IAF– 5.10 ⁶ totaux (100 µl) IAF sexé– 5.10 ⁶ totaux (100 µl) IAF– 5.10 ⁶ totaux (230 µl) IAF sexé– 5.10 ⁶ PMS (230 µl) IAC– 5.10 ⁶ PMS (paill. 0.25 ml) IAC sexé– 5.10 ⁶ PMS (paill. 0.25 ml)	Induction quand IA Induction quand IA 6 h après induction 6 h après induction 30 h après induction 30 h après induction	50 % (5/10) 25 % (5/20) 40 % (4/10) 38 % (6/16) 38 % (6/16) 13 % (2/15)	1 RE à 35 j
4	Morris et Allen, 2001 Exp 2 Exp 1	IAR 0,5.10 ⁶ PMS sexés IAF 0,5.10 ⁶ PMS non sexé IAC 5.10 ⁶ PMS (100 µl)	30-32 h post hCG 30-32 h post hCG	44 % X (4/9) 17 % Y (1/6) 31 % (4/13) 47 % (16/34)	
IAR					
8	Brinsko et al, 2003	IAR 5.10 ⁶ totaux (200 µl)	24 h post hCG	67 % (12/18)	Juments tranquillisées
IAC					
5	Alvarenga et Leao, 2002	IAC Percoll 10.10 ⁶ PMS IAC 10.10 ⁶ PMS	0-8 h après OV 0-8 h après OV	33,3 % (4/12) 33,3 % (4/12)	
11	Morris et al, 2003	IAC 14.10 ⁶ PMS (0,5 ml) IAC 3.10 ⁶ PMS (0,1 ml corne ipsilatérale) IAC 3.10 ⁶ PMS (0,1 ml corne controlatérale)	32h post hCG 32h post hCG 32h post hCG	64% (9/14) 47 % (16/34) 8 % (1/12)	
15	Delajarraud-Tauvent, 2003	IAC environ 50.10 ⁶ totaux - IA sur papille - IA, mais papille non visualisée	Pré ou post OV	25 à 40% (161) 11 à 14% (40)	

Dans tous les tableaux, les lignes portant le même numéro sont issues de la même étude

Tableau 5 : IA profonde par laparotomie
Surgical oviductal insemination technique

N°	Auteur – année	Type de préparation de la semence	Moment IA	Fertilité/cycle	Matériel
1	Mc Cue et al 1998	IA 50000 PMS dans oviducte (50 µl)	24-28 h post hCG	21 % (3/14) jusqu'à J30	Tranquillisation - incision flanc – laparotomie – IA par infudibulum

Dans tous les tableaux, les lignes portant le même numéro sont issues de la même étude

*Bilan et perspectives

Au cours de ces différentes expérimentations, les techniques d'insémination profonde dans la corne utérine ont permis d'obtenir des gestations. L'insémination profonde guidée par voie rectale et l'insémination par endoscopie sont les techniques les plus largement étudiées. Elles sont même déjà employées au niveau commercial.

a) Intérêts et inconvénients des principales techniques

IA profonde guidée par palpation rectale	IA profonde sous endoscopie
<ul style="list-style-type: none"> • lieu du dépôt de la semence imprécis • peu d'équipement sophistiqué, mise en place plus facile sur le terrain • cathéters et pistolet à l'étude ou commercialisés (l'emballage stérile individuel est proposé par certains) • risques de reflux du sperme dans le cathéter lorsque l'extrémité de ce dernier butte contre l'endomètre 	<ul style="list-style-type: none"> • lieu de dépôt précis sur la papille (jonction utéro-tubaire) minimisant les pertes de spermatozoïdes dans les cryptes de l'endomètre. • vidéo-endoscope (investissement élevé, sonde adaptée, maîtrise nécessaire de l'appareil et de l'orientation de la sonde dans l'utérus). • respect strict d'hygiène (stérilisation de la sonde limitant la fréquence d'utilisation). • irritation de l'endomètre dû à l'air soufflé et au passage de l'endoscope dans l'utérus.
IA profonde écho-guidée par voie rectale * non-visualisation de la jonction utéro-tubaire à l'échographie (contrôle moins précis du lieu de dépôt qu'à l'aide de l'endoscope)	
D'une façon générale, l'IA dans la corne provoquerait des irritations induisant une inflammation de l'utérus. L'incidence de l'introduction profonde dans l'utérus de matériel supposé stérile reste à être étudiée. Le respect strict des conditions d'hygiène est indispensable.	

b) Conclusion des différentes études

Les conditions expérimentales de tous ces travaux sont très spécifiques :

- Le nombre d'animaux testés est souvent faible. Il semble alors nécessaire de conforter les résultats de fertilité obtenus sur des effectifs plus larges par lot pour chaque technique employée.
- Un suivi gynécologique très précis des juments est à la base de tous ces essais (induction des ovulations à heures précises avec hCG (Chorulon) ou GnRH (OVUPLANT), échographie quotidienne voire plus).
- La semence choisie est soit sélectionnée soit issue d'étalon très fertile. Le sperme frais ou réfrigéré est davantage utilisé par rapport au sperme décongelé.
- Les résultats de fertilité obtenus soit à J16 ou par récolte d'embryons ne permettent pas de connaître l'incidence de la pénétration des cornes par du matériel exogène sur la croissance et l'implantation de la vésicule embryonnaire.
- La comparaison des résultats entre eux semble difficile pour toutes ces expérimentations puisque de nombreux critères diffèrent selon les essais (nombre total de spermatozoïdes par dose, volume des doses, type de semence fraîche, réfrigérée, décongelée, triée, sexée,...). De plus, les techniques d'insémination profonde ne sont pas comparées à la technique classique (insémination dans le corps) à l'exception de

deux auteurs (DELL'AQUA et al, 2001 et SQUIRES et al, 2002 (Colorado)) qui ne modifient dans leurs tests que le lieu de dépôt de la semence.

Il n'apparaît donc pas toujours clairement, si les taux de fertilité obtenus avec des faibles nombres de spermatozoïdes, sont liés au site d'IA ou plus simplement au fait qu'avec des étalons très fertiles, les IA peuvent être réalisées avec des nombres de spermatozoïdes inférieurs aux normes habituellement recommandées.

c) Perspectives

Des études complémentaires s'avèrent nécessaires pour confirmer la réussite des nouvelles techniques d'IA dans un premier temps afin de définir les seuils minimaux en nombre et en volume de spermatozoïdes. L'étape suivante serait de valider l'intérêt de l'IA profonde pour :

- la semence d'étalon à fertilité réduite,
- l'insémination directe de semence décongelée dans la paillette,
- les juments à problèmes (vieille, rétention utérine, endométrite chronique),
- les juments en post partum.

II – PARTIE EXPERIMENTALE

Deux expérimentations, l'une en sperme congelé et l'autre en sperme frais, ont été réalisées afin de comparer la fertilité obtenue après l'utilisation de 2 sites d'IA en utilisant le même nombre de spermatozoïdes :

- dans le corps de l'utérus, juste derrière le col : technique classique,
- en haut de la corne, du côté du follicule préovulatoire, guidée par palpation rectale.

Les IA dans le corps de l'utérus ont été réalisées avec un cathéter classique (référence 007350 - IMV, 10 rue Georges Clemenceau, BP 87, 61302 L'Aigle Cedex, France), sauf spécifications particulières. Lors des IA en haut de corne, guidées par voie rectale, le sperme était déposé dans le haut de la corne à la jonction uterotubaire du côté du follicule préovulatoire. Après avoir vidangé le rectum et nettoyé la région périnéale, le cathéter était introduit classiquement dans un 1^{er} temps dans le corps de l'utérus par voie vaginale, puis dans un 2^{ème} temps, guidé par voie rectale jusqu'au sommet de la corne utérine. Une légère traction transrectale est exercée à la jonction corps-corne de l'utérus de façon à rendre la corne choisie plus rectiligne et faciliter ainsi la progression du cathéter.

Après mesure de la fertilité par diagnostic de gestation à 14 jours, le test du X^2 a été utilisé pour comparer les taux de fertilité par cycle entre les lots à l'intérieur de chaque expérimentation.

Expérimentation I

L'objectif de cet essai était d'analyser l'effet du lieu d'insémination (dans le corps de l'utérus *versus* dans le haut de la corne) sur la fertilité sans modifier les autres facteurs. Une dose standard par IA de sperme congelé (400 millions de spermatozoïdes totaux avec un % de spermatozoïdes mobiles à la décongélation \geq 35%) a été retenue pour cet essai.

*** Matériel et méthodes**

a) Gestion des animaux :

Cinquante juments de sang (11 maiden, 9 vides et 30 suitées) de la station de Chamberet ont été inséminées en 2003, avec des doses de sperme congelé de qualité commercialisable de 2 étalons nationaux de race SF.

Les juments ont été réparties en 2 groupes correspondant à chacun des 2 étalons en veillant à équilibrer les lots en fonction de l'état physiologique (suitées ou non suitées) et du niveau alimentaire (niveau haut ou bas d'alimentation réalisés dans le cadre de leur appartenance à un autre protocole). Dans un groupe donné, le site d'insémination (corps ou corne) a été alterné en fonction de l'ordre chronologique du cycle et les

juments non fécondées ont été inséminées au niveau de l'autre site au cycle suivant. En cours de campagne d'IA, un réajustement a été effectué afin de maintenir un nombre de cycle équivalent en fonction des 2 sites d'insémination.

Les juments suitées ont été inséminées à partir du 15^{ème} jour après le poulinage à un moment où l'utérus a pratiquement terminé son involution et présente une taille normale.

Les inséminations étaient réalisées de façon à placer 2 IA par cycle et la dernière dans les 24 heures précédant le constat de l'ovulation (J0). La décision d'induction de l'ovulation par une injection d'hCG (1500 UI IV) était prise lorsque la jument en chaleur présentait une taille folliculaire supérieure ou égale à 35 mm. Les IA étaient réalisées le jour et le lendemain de l'injection d'hCG. Seules les ovulations constatées dans les 24 heures suivant la dernière insémination ont été retenues dans l'analyse.

b) Techniques d'insémination :

Les juments étaient inséminées soit selon la technique « témoin » avec dépôt de la semence dans le corps de l'utérus à l'aide du cathéter classique, soit en « haut de corne » en utilisant un cathéter spécial (référence 17207/1275, Minitüb Abfüll, Labortechnik, 41 Hauptstr., 84184 TIEFENBACH, Allemagne). Un constat de gestation était effectué le 14^{ème} jour post-ovulation et en cas de résultat positif, un diagnostic de confirmation était réalisé vers J35.

* Résultats et discussion

Sur les 67 cycles exploités, 54 présentaient un intervalle dernière IA-ovulation de 24h et ont été retenus pour l'analyse des résultats. La fertilité par cycle (à J14) n'a pas été différente entre les étalons ou entre les lieux d'insémination (6).

Aucune résorption embryonnaire n'a été observée entre J14 et J35. Une jument ayant présenté une ovulation sur chaque ovaire et ayant été inséminée dans le haut d'une des deux cornes a eu une gestation gémellaire indiquant la migration des spermatozoïdes jusqu'à l'ovaire controlatéral à l'insémination.

Tableau 6 : Fertilité par cycle en fonction du lieu de dépôt de la semence et de l'étalon.
Fertility per cycle according to insemination site and number of spermatozoa

Fertilité par cycle	ETALON I	ETALON II	TOTAL
IA dans le corps	67 % (10/15) ^a	58 % (7/12) ¹	63 % (17/27) ^A
IA haut de corne	39 % (5/13) ^a	79 % (11/14) ¹	59 % (16/27) ^A
Total	54 % (15/28)^c	69 % (18/26)^c	61 % (33/54)

Les pourcentages d'une même colonne ou d'une même ligne affectés de lettres, de chiffres ou de caractères différents, diffèrent significativement (P<0,05)

En insémination de sperme congelé avec des doses de 400.10⁶ spermatozoïdes par IA, il n'existe pas de différence significative de fertilité entre les juments inséminées dans le corps et celles inséminées dans le haut de la corne. Dans ces conditions, l'IA profonde n'a ni diminué, ni augmenté la fertilité.

Expérimentation II

Cette étude a été conduite sur des ponettes avec de la semence fraîche et notre objectif était de vérifier si la fertilité consécutive à des inséminations avec un faible nombre de spermatozoïdes était dépendante du site d'insémination.

* Matériels et méthodes

a) Gestion des juments :

Cette expérimentation a été réalisée à l'I.N.R.A. de Nouzilly en 2003 sur 90 ponettes Welsh. L'ovulation a été induite avec des extraits hypophysaires (CEG 15mg iv) lorsque les ponettes présentaient, à l'échographie, des signes de chaleurs et un follicule pré-ovulatoire dont le diamètre était \geq 33mm. Les ponettes ont toutes

été inséminées, avec du sperme frais, entre 27 et 30 heures après induction de l'ovulation. Elles ont été réparties au hasard en 3 lots de 30. Les ponettes du lot I ont été inséminées en IA traditionnelle dans le corps de l'utérus avec 200×10^6 spermatozoïdes totaux dans un volume total de 10 ml. Les ponettes du lot II ont été inséminées dans le corps de l'utérus avec 50×10^6 spermatozoïdes totaux dans un volume total de 0,5 ml. Les ponettes du lot III ont été inséminées en haut de corne avec 50×10^6 spermatozoïdes totaux dans un volume total de 0,5 ml.

b) Etalons :

Les 3 étalons poneys utilisés pour cette étude ont été répartis de manière équilibrée dans les 3 lots à concurrence de 10 ponettes inséminées par étalon et par lot. Ils ont été collectés tous les 3 jours et le sperme a été dilué dans l'INRA96® (référence 16441, IMV) à raison de 20×10^6 spermatozoïdes totaux /ml pour le lot I et 100×10^6 /ml pour les lots II et III. Les inséminations ont eu lieu dans l'heure qui suivait la collecte de l'étalon.

c) Techniques d'inséminations :

Les ponettes du lot I ont été inséminées avec le cathéter classique et le sperme était conditionné en seringue. Les ponettes des lots I et II recevant une faible dose dans un faible volume ont été inséminées avec 1 pistolet rigide, comprenant 1 chemise et 1 gaine sanitaire, normalement utilisé pour le transfert des embryons équins au stade jour 8 (seringue spirale de transfert pour embryon de grosse taille IMV, référence 017446 ; IMV) et utilisable chez la ponette, du fait des faibles dimensions de l'utérus. Le sperme était conditionné immédiatement avant l'IA en paillette de 0,5 ml (référence 005569 ; IMV). La fertilité a été mesurée par échographie de l'utérus 14 jours post ovulation.

*** Résultats et discussion**

Comme nous pouvons le constater dans le tableau 7, quelle que soit la méthode utilisée, nous n'avons pas observé de différence significative globale entre les différents lots. La fertilité n'a été influencée ni par l'étalon, ni par la technique d'insémination et, ce qui est également surprenant, ni par le nombre de spermatozoïdes inséminés.

Tableau 7 : Fertilité par cycle et par étalon en fonction du site d'insémination et du nombre de spermatozoïdes inséminés. *Fertility per cycle according to insemination site and number of spermatozoa.*

Fertilité par cycle	Etalon I	Etalon II	Etalon III	Total
(I). IA dans le corps 200×10^6 spz	7/10 (70%)	7/10 (70%)	8/10 (80%)	22/30 (73%)
(II). IA dans le corps 50×10^6 spz	6/10 (60%)	7/10 (70%)	8/10 (80%)	21/30 (70%)
(III). IA en haut de corne 50×10^6 spz	5/10 (50%)	7/10 (70%)	8/10 (80%)	20/30 (67%)
Total	18/30	21/30	24/30	63/90 (70%)

Discussion sur les deux expérimentations

Suite à ces études, nous n'avons pas observé d'amélioration des taux de fertilité en pratiquant une insémination profonde.

Au cours de la 1^{ère} expérimentation avec des doses standard de sperme congelé, nous n'avons observé aucun effet du site de l'insémination sur le taux de fertilité. Il paraît logique que, avec un nombre élevé de spermatozoïdes dans un volume élevé de dilueur et avec des étalons fertiles, nous n'ayons pas obtenu un gain de fertilité en inséminant près de la jonction utéro-tubaire. Mais contrairement aux observations de SQUIRES et al 2002 (Etude 7, Tableaux 1 et 2), nous n'avons pas remarqué de chute de fertilité liée à la pratique de l'insémination en haut de corne.

Au cours de la 2^{ème} étude, avec, cette fois, un nombre réduit de spermatozoïdes dans un faible volume, le lieu d'insémination n'a pas eu plus d'incidence sur le taux de conception. Nous avons choisi d'inséminer les ponettes avec un pistolet de transfert. Ce matériel offre la garantie de déposer 100% du volume de semence dans l'utérus. Avec les autres matériels, on observe parfois un reflux de la semence intra-cathéter, ou la non complète expulsion du volume à inséminer : ce qui revêt une grande importance lorsque l'on utilise des faibles volumes. Cependant la longueur de ce pistolet de transfert n'est pas suffisante pour inséminer des juments de selle en haut de corne, et son faible diamètre pourrait être traumatique pour la corne utérine.

Nos résultats montrent d'une part que la pratique de l'insémination profonde n'est pas dommageable pour la jument, et d'autre part qu'avec des étalons fertiles, en sperme frais utilisé immédiatement, la réduction du nombre de spermatozoïdes et du volume inséminé ainsi que le site d'insémination n'affectent pas la fertilité. Il peut être envisagé, si le nombre de juments à servir est trop important, de réduire le nombre de spermatozoïdes par dose d'insémination, à condition que les juments soient inséminées sur le lieu de collecte de l'étalon. Il est également envisageable de réduire les volumes inséminés chez les juments présentant des réactions inflammatoires post insémination. Cependant les résultats de l'expérimentation II, sont à prendre avec précautions pour les raisons suivantes :

- les animaux (mâles et femelles) avaient une fertilité élevée,
- les IA étaient pratiquées avec de la semence fraîche non conservée, 6 à 9 h avant ovulation, dans la majorité des cas
- les femelles inséminées étaient des ponettes
- l'inséminateur bénéficiait d'une expérience préalable.

Il semble clair qu'outre la fertilité des animaux, l'expérience de l'inséminateur et le choix du matériel soient essentiels. Il serait souhaitable de poursuivre cette expérimentation avec du sperme de qualité moindre.

IV- CONCLUSION GENERALE

Face à la pression commerciale, l'intérêt de réduire le nombre de spermatozoïdes par dose d'IA est évident pour les gestionnaires d'étalons. Les différents travaux publiés sur ce thème ne permettent cependant pas de conclure sur un effet dose ou lieu compte tenu de la diversité et de la multiplicité des éléments comparés (nombre de spermatozoïdes, lieu, traitements de la semence ou de la jument, moment d'IA, ...).

De plus, les expérimentations I et II, utilisant des doses de 400×10^6 spermatozoïdes (sperme congelé) ou 50×10^6 spermatozoïdes (sperme frais) ont montré des résultats de fertilité comparables vis à vis du site d'insémination (corps ou corne de l'utérus). Dans nos conditions expérimentales, l'effet du site d'insémination n'est donc pas mis en évidence.

Dans l'état actuel des connaissances, il n'est pas prudent de descendre en dessous des seuils français (sperme congelé = 400×10^6 spermatozoïdes totaux par IA et sperme frais = 200×10^6 spermatozoïdes totaux par IA). Une piste s'ouvre éventuellement pour réduire le nombre de spermatozoïdes en semence fraîche utilisée immédiatement. Des investigations supplémentaires (et les équipes scientifiques y travaillent) sont nécessaires afin de définir des normes suffisamment fiables.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ALVARENGA, M.A, LEO, K.M. (2002) Hysteroscopic insemination of mares with low numbers of frozen thawed spermatozoa selected by percoll gradient. *Theriogenology* 58, 651-653.
- BERGER, G.S; (1987) Intratubal insemination. *Fertil Steril*, Aug 48(2), 320-330
- BRINSKO SP, RIGBY SL, LINDSEY AC, BLANCHARD TL, LOVE CC, VARNER DD (2003). Pregnancy rates in mares following hysteroscopic or transrectally-guided insemination with low sperm numbers at the utero-tubal papilla. *Theriogenology*. 2003 Feb; 59(3-4): 1001-9.

- BUCHANAN, B.R., SEIDEL, G.E., Mc CUE, P.M., SCHENK, J.L., HERICKHOFF, L.A., SQUIRES, E.L. (2000) Insemination of mares with low numbers of either unsexed or sexed spermatozoa. *Theriogenology* 53, 1333-1344.
- CARNEVALE, E.M., MACLELLAN, L.J., COUTINHO da SILVA, M.A., SQUIRES, E.L. (2001) Equine sperm-oocyte interaction : results after intraoviductal and intrauterine inseminations of recipients for oocyte transfer. 3rd International symposium on stallion reproduction, Jan 10-12, 31.
- DELAJARRAUD-TAUVENT H. (2003). Insémination sous endoscopie chez la jument. Bilan de trois saisons de monte. Journée de l'Association pour l'Etude de la Reproduction Animale – Alfort, 2 décembre 2003 : 47-57.
- DELL'AQUA Jr, J.A., PAPA, F.O., ALVARENGA, M.A., ZAHN, F.S. (2001) Effects of warning rate on sperm parameters and of insemination site and dose on the fertility of equine frozen semen. 3rd International symposium on stallion reproduction, Jan 10-12, 64.
- INSTITUT DU CHEVAL, 2^{ème} édition 1996. Insémination artificielle équine – Guide pratique
- LEAO, K.M., ALVARENGA, M.A., LANDIM, F.C., PAPA, F.O. (2001) Improvement of motility, longevity and viability of frozen stallion sperm selected by discontinuous Percoll density gradient. 3rd International symposium on stallion reproduction, Jan 10-11, 62.
- LEAO, K.M., ALVARENGA, M.A., PUOLLI-FILHO, J.N. (2002) Hysteroscopic insemination in mares with low sperm sperm. *International Embryo Transfer Society, Theriogenology* 57, 381.
- LINDSEY, A.C., BRUEMMER, J.E., SQUIRES, E.L. (2001) Low dose insemination of mares using non sorted and sex-sorted sperm. *Animal Reproduction Science* 68, 279-289.
- LINDSEY, A.C., MORRIS, H.A., ALLEN, W.R., SCHENK, J.L., SQUIRES, E.L., BRUEMMER, J.E. (2002 a) Hysteroscopic insemination of mares with low numbers of nonsorted or flow sorted spermatozoa. *Equine Vet. J.* 34 (2) 128-132.
- LINDSEY, A.C., VARNER, D.D., SEIDEL Jr., G.E., BRUEMMER, J.E., SQUIRES, E.L. (2002 b) Hysteroscopic or rectally guided, deep-uterine insemination of mares with spermatozoa stored 18 h at either 5°C or 15°C prior to flow-cytometric sorting. *Theriogenology* 58, 659-662.
- MANNING, S.T; BOWMAN, P.A; FRASER, L.M; CARD, C.E. (1998) Development of hysteroscopic insemination of the uterine tube in the mare. In: *Proceedings of Annual Meeting Society for Theriogenology, Baltimore, MD, 84-85.*
- MAXWELL, W.M. EVANS, G. HILLARD, M.A. BINDOM, B.M. (1993) Fertility of superovulated ewes after intrauterine or oviducal insemination with low numbers of fresh or frozen-thawed spermatozoa. *Reprod Fertil Dev.* 1993; 5(1): 57-63.
- Mc CUE, P.M., FLEURY, J.J., DENNISTON, D.J., GRAHAM, J.K., SQUIRES, E.L. (1998) Oviductal insemination of mares. *Journal of Reproduction and fertility Supplement* 56, 499-502.
- MORRIS Lee, H.A., ALLEN, W.R. (2001) Hysteroscopic utero-tubal insemination of mares with low numbers of spermatozoa. 3rd Symposium international symposium on stallion reproduction, Jan 10-12, 48.
- MORRIS Lee, H.A., HUNTER, R.H.F., ALLEN, W.R. (2000) Hysteroscopic insemination of small numbers of spermatozoa at the uterotubal junction of preovulatory mares. *Journal of Reproduction and fertility* 118, 95-100.
- MORRIS, L.H.A., ALLEN, W.R. (2002) An overview of low dose insemination in the mare. *Reprod. Dom. Anim.* 37, 206-210.
- MORRIS, L.H.A., TIPLADY, C. and ALLEN, W.R. (2003) Pregnancy rates in mares after a single fixed time hysteroscopic insemination of low numbers of frozen-thawed spermatozoa onto the uterotubal junction. *Equine Veterinary Journal.* 35, 197-201.
- NIE, G.J., JOHNSON, K.E., WENZEL, J.G.W. (2003) Pregnancy outcome in mares following insemination deep in the uterine horn with low numbers of sperm selected by glass wool/Sephadex filtration, Percoll separation or absolute number. *Animal Reproduction Science.* 79, 103-109.
- PETERSON, M.M., WESSEL, W.T., SCOTT, M.A., LIU, I.K.M., BALL, B.A. (2002) Embryo recovery rates in mares after deep intra-uterine insemination with low numbers of cryo preserved equine spermatozoa. *Theriogenology* 58, 663-665.
- RIGBY, S. DERCZO, S., BRINSKO, B.S., BLANCHARD, T., TAYLOR, T., FORREST, D.W., VARNER, D., (2000) Oviductal sperm numbers following proximal uterine horn or uterine body insemination. *AAEP Proceedings, Vol 46, 332-334.*

- RIGBY, S.L., LINDSEY, A.C., BRINSKO, S.P., BLANCHARD, T.L., LOVE, C.C., VARNER, D.D. (2001) Pregnancy rates in mares following hysteroscopic of rectally-guided utero-tubal insemination with low sperm numbers. 3rd International symposium on stallion reproduction, Jan 10-12, 49.
- ROUSSET, H. (1986) Insémination artificielle équine : résultats français. Colloque International « Méthodes Modernes de Reproduction dans l'Espèce Equine ». Paris. 12 mars 1986.
- SQUIRES, E.L., LINDSEY, A.C., BUCHANAN, B.R. (2000) A method to obtain pregnancies in mares using minimal sperm numbers. AAEP Proceedings, Vol 46, 335-337.
- SQUIRES, E.L., REGER, H.P., MACLELLAN, L.J., BRUEMMER, J.E. (2002) Effect of time of insemination on pregnancy rates with frozen semen. Theriogenology 58, 655-658.
- TROEDSSON, MH. 1999: Uterine clearance and resistance to persistent endometritis in the mare. Theriogenology. Aug; 52(3): 461-71.
- VASQUEZ, J.J, MEDINA, V ; LUI, I.K ; BALL, B.A ; SCOTT, M.A.(1998) Non-surgical utero-tubal insemination in the mare. In: Proceedings of Annual Meeting Society for Theriogenology, Baltimore, MD, 82-83.
- VIDAMENT M, ECOT P., DUPERE AM, NOUE P, BOURGEOIS C, COUTY C, YVON JM, MAGISTRINI M. & PALMER E (1998). La semence congelée d'étalon : améliorations récentes. 24^{ème} journée de la recherche équine : 25-38 .
- VIDAMENT M., MAGISTRINI M., PALMER E. & CLEMENT F.(2000). Equine artificial insemination in french national studs. Reproduction in Domestic Animals, suppl 6, 61-66.