



## L'INRA96, UN MILIEU DE CONSERVATION DE LA SEMENCE D'ÉTALON AUX TEMPÉRATURES DE 4°C ET 15°C

Par :

<sup>1</sup>F. Batellier, <sup>1</sup>M. Vidament, <sup>1</sup>G. Duchamp,  
<sup>1</sup>J.M. Yvon, <sup>2</sup>G. Arnaud, <sup>3</sup>J.P. Jourdain et <sup>1</sup>M. Magistrini

<sup>1</sup>Equine Reproduction Equine

I.N.R.A.-Haras Nationaux, Unité P.R.C.

37380 - Nouzilly - France

<sup>2</sup>Station expérimentale des Haras Nationaux

19140 Chamberet - France

<sup>3</sup>Haras National

56700 Hennebont - France

### Résumé

L'insémination artificielle de semence fraîche d'étalon après 24 heures de conservation est une technique en pleine expansion en raison du développement du transport de doses d'insémination. Cependant les résultats obtenus, en terme de fertilité, étaient peu satisfaisants jusqu'alors. Les expériences réalisées de 1994 à 1996 (Batellier et al., 1997a, 1998) ont montré que la technique mise au point dans notre laboratoire (milieu INRA96, conservation de la semence à 15°C en conditions aérobies), comparée aux techniques traditionnelles (milieux à base de lait, conservation de la semence à 4°C en conditions anaérobies) permettait d'améliorer significativement la fertilité par cycle après conservation de la semence pendant 24 heures. De nouvelles expériences de fertilité nous ont permis de préciser les points suivants : 1) lors de conservation de la semence inférieure à 12 heures, le milieu INRA96 (15°C aérobie ou 4°C anaérobie) ne paraît pas plus efficace que le lait ½ écrémé, 2) lors de conservation de la semence pendant 24 heures, l'INRA96 est aussi efficace à la température de 15°C (aérobie) qu'à la température de 4°C (anaérobie) ; de plus l'INRA96 (4°C anaérobie) montre une tendance à l'amélioration de la fertilité, comparé aux conditions traditionnelles (milieu de Kenney ou EZ-Mixin, 4°C anaérobie).

Ces résultats permettent d'envisager, selon les besoins, et en fonction de la qualité de la semence des étalons, d'utiliser le milieu INRA96 à la fois à la température de 15°C et de 4°C.

**Mots-clés :** étalon - spermatozoïdes - conservation - insémination artificielle - sperme réfrigéré

### Summary

Artificial insemination with chilled and transported semen is in progress since few years. Unfortunately, Pregnancy rates after delayed AI, are still low and variable. From 1994 to 1996, we have demonstrated that INRA96 extender used at 15°C under aerobic conditions improved significantly fertility per cycle compared to traditional milk extenders used at 4°C under anaerobic conditions after 24 hours storage (Batellier et al., 1997a, 1998). Recent fertility trials have demonstrated that : 1) when sperm was stored for less than 12 hours, INRA96 extender, used at 15°C (aerobic conditions) or at 4°C (anaerobic conditions), did not seem to be more efficient than half skim milk, 2) when sperm was stored for 24 hours, INRA96 extender was as efficient at 15°C (aerobic conditions) than at 4°C (anaerobic conditions) ; more, INRA96 extender used at 4°C (anaerobic conditions) compared to EZ-Mixin at 4°C (anaerobic conditions) seems to improve fertility per cycle but this tendency has to be confirmed.

These results demonstrate that INRA96 extender can be used at 15°C or at 4°C, according to the experiments and depending mainly on the quality of stallion sperm.

**Key-words :** stallion - spermatozoa - storage - artificial insemination - chilled semen

## INTRODUCTION

L'insémination artificielle (I.A.) de semence fraîche après 24 heures de conservation est une méthode qui, jusqu'à ces dernières années, ne donnait que des résultats peu ou pas satisfaisants aussi bien dans notre laboratoire que dans les laboratoires étrangers. Lors des essais qui ont été conduits dès 1986 à Nouzilly puis à la station expérimentale des Haras nationaux de Chamberet, la sélection et le suivi des animaux étaient stricts. La semence des étalons devait alors répondre aux critères de qualité suivants : la mobilité des spermatozoïdes devait être supérieure à 70% à la récolte, supérieure à 40% et 30% après respectivement 24 et 48 heures de survie à 4°C. Par ailleurs la croissance folliculaire des juments était contrôlée quotidiennement par échographie afin d'inséminer dans les 24 heures précédant l'ovulation. La fertilité par cycle après dilution de la semence dans un milieu à base de lait (INRA82 ou Kenney) et conservation pendant 24 heures à la température de 4°C avant insémination était d'environ 25%.

Les études réalisées dans notre laboratoire ont d'abord porté sur la mise au point d'un milieu chimiquement défini composé de sels et de sucres permettant une conservation de plus d'une journée. Ces premiers travaux ont abouti à la mise au point du milieu HGLL-BSA composé de sels de Hank's, de concentrations élevées de glucose (13.21g/L soit 0.073M) et de lactose (45.39g/L soit 0.126M), et supplémenté de 1% (p/v) de sérum albumine bovine. Ce milieu permettait de conserver les spermatozoïdes à la température de 15°C en conditions aérobies (figure 1) pendant au moins 24 heures. La conservation de la semence à la température de 15°C avait pour objectif de limiter les effets néfastes du « cold shock » qui intervient, pour les spermatozoïdes d'étalon, entre 19°C et 8°C et qui se traduit par une perte de la mobilité. Nos résultats in vitro restaient cependant inférieurs à ceux obtenus après dilution de la semence dans le lait UHT ou dans les milieux à base de lait utilisés à la température de 4°C.

L'étape suivante a été d'identifier les composants du lait qui étaient spécifiquement nécessaires à la conservation des spermatozoïdes d'étalon. Le lait est en effet un milieu complexe de composition variable et dont l'effet des composants sur les spermatozoïdes était mal connu. La collaboration avec le Laboratoire de Technologie Laitière de l'INRA de Rennes, dirigé par Monsieur J-L. Maubois, nous a permis d'obtenir des fractions purifiées du lait qui ont été testées sur la survie des spermatozoïdes et sur leur fertilité. Ce travail a fait l'objet de la thèse de F. Batellier. Les résultats obtenus nous ont permis de définir une nouvelle méthode de conservation de la semence d'étalon en vue d'inséminations différées de 24 heures minimum (Batellier et al., 1997a, 1997b, 1998). Ce nouveau milieu est composé de HGLL supplémenté de phosphocasinat natif. Cette fraction du lait est constituée de l'ensemble des caséines à l'état natif, c'est à dire ayant conservé la structure micellaire qu'elles ont dans le lait. Cette technique portant sur la mise au point d'un milieu, l'INRA96, et d'un mode de stockage de la semence (conditions aérobies, température de 15°C) a été brevetée en février 1997 et sera développée sur le terrain dès la saison de monte 2001 par la société I.M.V.. Cet article fait le bilan de toutes les expériences de fertilité qui ont été réalisées de 1996 à 2000 à l'INRA de Nouzilly et dans les stations (expérimentales ou non) des Haras nationaux.

## MATERIEL ET METHODES

### • Les milieux

Au cours des différentes expériences, les milieux suivants ont été utilisés :

- le lait ½ écrémé,
- le milieu INRA96 composé de HGLL supplémenté par la fraction phosphocasinat natif,
- le milieu INRA82 composé de lait écrémé et d'une solution saline (v/v) ; il constitue la base des milieux de congélation,
- le milieu de Kenney composé d'une solution de glucose et de lait écrémé déshydraté ; ce milieu est également commercialisé sous le nom d'EZ-Mixin.

Dans toutes les expériences, le milieu INRA96 a été comparé à un milieu témoin lait (½ écrémé) ou à base de lait (INRA82 ou Kenney).

## • Les conditions d'incubations

Lorsque la semence a été conservée à 4°C, les conditions d'incubation ont été anaérobies quel que soit le milieu de dilution. Par contre lors de conservation à 15°C, la semence a été conservée en conditions aérobies (figure 1).

## • Les inséminations artificielles

Les conditions ont légèrement varié en fonction des lieux d'expérimentation.

- *INRA de Nouzilly et stations expérimentales de Chamberet et de la Jumenterie du Pin* : les essais ont été réalisés sur des éjaculats partagés et le rythme d'insémination artificielle a été de 48 heures strictes après détection des chaleurs des juments ou d'un follicule préovulatoire par échographie

- *Haras National d'Hennebont (stations de Vitré et d'Hennebont)*: les essais ont été réalisés en alternance (toutes les 3 semaines). Pour un étalon donné, le dilueur était changé toutes les 3 semaines. Le rythme d'insémination artificielle a été de 3 fois par semaine après détection des chaleurs des juments.

Les doses d'insémination étaient, dans tous les cas, composées de 10 mL de dilueur contenant un nombre total de  $200 \times 10^6$  de spermatozoïdes.

## RÉSULTATS

### 1°/ Conservation de la semence à la température de 15°C après dilution dans le milieu INRA96

Quatre expériences ont été réalisées à l'INRA de Nouzilly, dans les stations expérimentales de Chamberet et de la Jumenterie du Pin (Batellier et al., 1997a, 1998) ainsi qu'à la station de Vitré.

- *La première expérience* a été « multicentrique » (de 1994 à 1996) et a porté sur la comparaison suivante : la semence a été diluée dans les milieux INRA96 (15°C, aérobie), INRA82 ou Kenney (4°C, anaérobie) puis conservée pendant 24 heures avant insémination. La fertilité par cycle a été significativement améliorée après conservation dans le milieu INRA96 (57%, n=176) par rapport aux autres milieux (41%, n=171) ( $p < 0.001$ ).
- *La seconde expérience* a été réalisée à l'INRA de Nouzilly (1996). La semence a été diluée dans le milieu INRA96 puis inséminée immédiatement ou bien après 3 jours de conservation à la température de 15°C en conditions aérobies. La fertilité par cycle a été respectivement de 68%, (n=50) et de 48%, (n=52) ( $p < 0.01$ ).
- *La troisième expérience* a été réalisée à la station de Vitré (1998). La semence de 5 étalons de trait a été diluée dans l'INRA96 (conservation 15°C, aérobie) ou dans le lait ½ écrémé (conservation 4°C, anaérobie) et inséminée dans la journée après « transport des doses ». La fertilité par cycle a été respectivement de 27% (n=52) et de 28% (n=57).
- *La quatrième expérience* s'est déroulée à la station expérimentale de Chamberet (2000). La semence de 3 étalons a été diluée dans l'INRA96 puis conservée à la température de 15°C (aérobie) ou de 4°C (anaérobie) pendant 24h avant insémination. Soixante douze cycles de juments ont été exploités et la fertilité par cycle a été de 54% dans les 2 lots (tableau 1).

### 2°/ Conservation de la semence à la température de 4°C après dilution dans le milieu INRA96

Les différents essais de fertilité réalisés précédemment ne portaient que sur des comparaisons entre le milieu INRA96 (conservation 15°C, aérobie) et les milieux traditionnels au lait INRA82 ou Kenney (conservation 4°C, anaérobie). Nous avons voulu tester le milieu INRA96 à la température de 4°C (condition anaérobie) et nous l'avons comparé aux milieux traditionnellement utilisés à cette température. Deux expériences ont été réalisées :

- *La première* a été menée au Haras national d'Hennebont (1998). La semence de 9 étalons de trait a été diluée dans le lait ½ écrémé (4°C, anaérobie) ou dans l'INRA96 (4°C, anaérobie). Après transport de doses et insémination dans la journée, la fertilité par cycle a été respectivement de 47% (n=264) et de 53% (n=295) (différence non significative).
- *La seconde* a été réalisée à l'INRA de Nouzilly (2000). Nous avons analysé la fertilité de la semence conservée pendant 24 heures à 4°C après dilution dans l'INRA96 ou l'EZ Mixin . Notre choix s'est porté

- *La seconde a été réalisée à l'INRA de Nouzilly (2000). Nous avons analysé la fertilité de la semence conservée pendant 24 heures à 4°C après dilution dans l'INRA96 ou l'EZ Mixin . Notre choix s'est porté sur l'EZ-Mixin car c'est le milieu le plus utilisé pour le transport de doses et l'insémination différée aux USA.*

La semence de 4 poneys Welsh a été diluée dans ces 2 milieux et la mobilité des spermatozoïdes a été analysée (analyse automatisée, IVOS, HTR, Danver USA) dès la dilution et juste avant insémination. La fertilité par cycle a été de 59% (n=39) après dilution dans le milieu INRA96 et de 49% après dilution dans le milieu EZ-Mixin (différence non significative). Cette tendance à l'amélioration par l'INRA96 a été observée pour 3 étalons (les moins fertiles) sur 4 (tableau 2). Par ailleurs l'analyse automatisée de la mobilité des spermatozoïdes après 24 heures de conservation à la température de 4°C a montré que le pourcentage de spermatozoïdes rapides dans le milieu INRA96 a été de 80% et de 69% dans le milieu EZ-Mixin.

## DISCUSSION ET CONCLUSION

Nos résultats montrent l'efficacité de notre nouvelle technique (INRA96, 15°C, aérobie) comparée aux techniques traditionnelles (INRA82 ou Kenney, 4°C, anaérobie) lors de conservation de la semence pendant 24 heures. De plus cette technique permet de conserver de la semence à 15°C pendant 3 jours ; il semble désormais indispensable de confirmer ces résultats concernant une conservation longue de la semence (supérieure à 24 heures).

Par ailleurs les résultats obtenus après 24 heures de conservation (1994 à 1996) montrent que la fertilité de certains étalons a été améliorée par la conservation de la semence à 15°C (tableau 3). Ceci laisse envisager une alternative pour les étalons dont la semence ne supporte pas les effets néfastes du cold shock lors de la descente de température à 4°C.

Il est à noter également que nous n'avons pas observé d'amélioration de la fertilité lors d'inséminations artificielles après conservation de la semence dans la journée aussi bien à 15°C qu'à 4°C. Ces résultats montrent que le milieu INRA96 est plutôt adapté à de la conservation de semence de longue durée.

Les résultats obtenus pendant la saison de monte 2000 montrent que la température (4°C ou 15°C) ne modifie pas la fertilité par cycle après dilution et conservation de la semence pendant 24 heures dans le milieu INRA96. Ceci permet d'envisager des expéditions de semence puisque que nous disposons, à l'heure actuelle, de systèmes autonomes de maintien de la température à 4°C, contrairement à ce qui se passe pour la température de 15°C. Enfin, l'utilisation du milieu INRA96 dans les conditions traditionnelles (4°C, anaérobie) comparé au milieu EZ-Mixin (4°C, anaérobie) a montré une tendance à une amélioration de la fertilité qui doit être confirmée (tableau2).

En conclusion, les applications de ce travail sont multiples : le transport de doses sur de plus longues distances, la gestion des étalons, qui mènent en parallèle une carrière sportive et une carrière de reproducteur et qui sont souvent absents des lieux de récolte de la semence 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 (cf. tableau 3). 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 la température de 4°C ou la congélation. Enfin, on pourrait envisager une conservation de la semence dans l'INRA96 à la température de 4°C lors de transport de doses, et une conservation à 15°C lorsque les inséminations peuvent être réalisées sur place.

*Nous tenons à remercier Monsieur J-L. Maubois et ses collaborateurs, en particulier Monsieur Jacques Fauquant, non seulement pour la préparation des fractions purifiées de lait mais également pour les discussions et critiques scientifiques constructives que nous avons eues au cours de ces études. Par ailleurs les expériences in vivo n'auraient pas pu se faire sans la collaboration de nos collègues des Haras nationaux.*

## BIBLIOGRAPHIE

- BATELLIER F., DUCHAMP G., YVON J.M., VIDAMENT M., ARNAUD G., MOUYSSSET C., VINCENT P., PALMER E., MAGISTRINI M., 1997a. Mise au point d'un dilueur chimiquement défini pour l'insémination artificielle immédiate ou différée. 23<sup>ème</sup> Journée d'Etude, 26 février 1997, Paris, 97-105.
- BATELLIER F., MAGISTRINI M., FAUQUANT J., PALMER E., 1997b. Effect of milk fractions on survival of equine spermatozoa. *Theriogenology*, 48, 391-410.
- BATELLIER F., MAGISTRINI M., MAUBOIS JL., PALMER E. "Dilueur de sperme comprenant du phosphocaseinate natif ou de la  $\beta$ -lactoglobuline, son procédé de préparation et ses utilisations".  
Dépôt du brevet le 25 février 1997, référence : INRA 97 02198.  
Extension européenne en 1998, référence : 98910822.0
- BATELLIER F., DUCHAMP G., VIDAMENT M., ARNAUD G., PALMER E., MAGISTRINI M., 1998.  
Delayed insemination is successful with a new extender for storing fresh equine semen at 15°C under aerobic conditions. *Theriogenology* 50, 229-236

**Tableau 1**

Fertilité par cycle après dilution de la semence dans le milieu INRA96 (15°C condition aérobie ; 4°C condition anaérobie) et conservation pendant 24 heures avant insémination (Chamberet 2000)

Etalons	INRA96 (15°C, aérobie)	INRA96 (4°C, anaérobie)	Signification
Darch	80% (n=10)	56% (n=9)	NS
Rosy	46% (n=13)	55% (n=11)	NS
Vallon	43% (n=14)	53% (n=15)	NS
Total	54% (n=37)	54% (n=35)	NS

**Tableau 2**

Fertilité par cycle après dilution de la semence dans les milieux INRA96 (4°C, condition anaérobie) ou EZ-Mixin (4°C, condition anaérobie) et conservation pendant 24 heures avant insémination (Nouzilly, 2000)

Etalons	INRA96 (4°C, anaérobie)	EZ-Mixin (4°C, anaérobie)	Signification
MW210	55% (n=11)	44% (n=9)	NS
MW219	29% (n=7)	17% (n=6)	NS
MW329	80% (n=10)	44% (n=9)	NS
Altkirsch	64% (n=11)	67% (n=15)	NS
Total	59% (n=39)	49% (n=39)	NS

**Tableau 3**

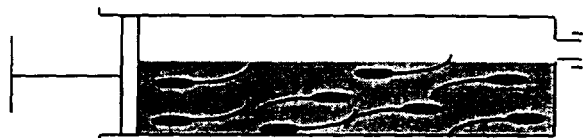
Fertilité par cycle après dilution de la semence dans le milieu INRA96 (15°C, condition aérobie) et les milieux Kenney ou INRA82 (4°C, condition anaérobie) et conservation pendant 24 heures avant insémination (Batellier et al., 1997a)

	INRA82 ou Kenney (4°C, anaérobie)	INRA96 (15°C, aérobie)	Signification
Etalon fertilité/cycle < 36%	30% (n=81)	48% (n=82)	P<0.05
Etalon fertilité/cycle < 36%	51% (n=90)	65% (n=94)	NS
Total	41% (n=171)	57% (n=176)	P<0.001

**Figure 1**

Différentes conditions d'incubation des doses d'insémination

1°/ Condition aérobie, 15°C



2°/ Condition anaérobie, 4°C

