



## STRATÉGIES D'INSÉMINATION, NOUVEAUTÉS ET BILAN

E. Guitton<sup>1</sup>, F Clément, R. Malha, J.C. Meriaux, G. Arnaud, M. Guérand,  
P. Vincent, L. LeMasne de Chermont, et M. Vidament

<sup>1</sup>Les Haras Nationaux, Direction du développement  
La Jumenterie du Pin, 61310 EXMES

### Résumé

En utilisant de la semence fraîche, Clément et collaborateurs (2000) ont montré que, en cas d'inséminations multiples, l'insémination la plus proche de l'ovulation n'était pas la plus fréquemment fécondante. Ce type d'expérimentation a été repris avec de la semence fraîche (fertile) puis avec de la semence réfrigérée et conservée (subfertile). Les juments ont été inséminées (200.10<sup>6</sup> spz/dose) avec de la semence d'étalons différents soit 72 et 24 h (Groupe A) soit 96 et 48h (Groupe B) avant l'ovulation. La paternité des embryons collectés 10 à 12 jours après l'ovulation a été déterminée par typage ADN. Avec de la semence fraîche, le taux d'embryons par ovulation est le même pour les inséminations réalisées 24, 48 et 72h avant ovulation et chute significativement à 96h (P<0,05). Avec de la semence réfrigérée et conservée, la fertilité diminue progressivement avec l'allongement de l'intervalle insémination - ovulation. La fertilité globale n'est pas significativement différente entre les groupes A et B, mais une tendance en faveur du groupe A est observée quel que soit le type de semence (fraîche 74 vs 57% ; réfrigérée 38 vs 28%). Ces résultats confirment que, en cas d'inséminations multiples sur une même chaleur, l'insémination la plus proche de l'ovulation n'est pas toujours l'insémination fécondante, aussi bien en semence fraîche qu'en semence réfrigérée et conservée. La fertilité globale après plusieurs inséminations pourrait résulter d'un cumul des potentiels fécondants de chaque insémination.

**Mots-clés :** *Insémination - jument - étalon - spermatozoïde - fertilité*

### Summary

When using fresh semen, Clément *et al.*, (2000) demonstrated that the insemination closest to ovulation is not the most frequently the fertilizing one. The same study was performed with fresh and chilled stored semen, using standardized insemination doses and controlled insemination-ovulation intervals. Mares were inseminated (200.10<sup>6</sup> spermatozoa /dose) with semen from different stallions either at 72 and 24 h (Group A) or at 96 and 48 h (Group B) before ovulation. Ovulation was induced with hCG. Paternity of embryos was determined using DNA typing after collection 10-12 days after ovulation. Using fresh semen, the conception rate was similar for inseminations at 24, 48 and 72 h before ovulation and decreased significantly at 96 h (P<0.05). Using chilled-stored semen, the conception rate decreased while interval between insemination and ovulation increased. The overall conception rate was not significantly different between Group A and B, but tended to be higher for group A for the two types of semen (fresh 74 vs 57%; chilled-stored 38 vs 28%). These results confirm that the insemination closest to ovulation is not necessarily the fertilizing one, not only with fresh semen but also with chilled-stored semen. The overall conception rate with several inseminations may be due to a cumulative effect of the pregnancy rate of each insemination.

**Key-words :** *insemination - mare - stallion - spermatozoa - fertility*

## I - INTRODUCTION

La fertilité dans l'espèce équine est étroitement liée à la qualité de la semence et à la technique de monte utilisée. Toute technique de monte donnant une fertilité par cycle moyenne supérieure ou égale à 50% est considérée comme fertile, dans le cas contraire on parle de semence subfertile. Hormis la monte naturelle, l'insémination immédiate de semence fraîche est la technique la plus fertile avec en moyenne 53% de fertilité par chaleur. La conservation de la semence conduit à une baisse de la fertilité. La fertilité par cycle de la semence conservée à 4°C pendant 24 h est comprise entre 13 et 39% en fonction des dilueurs conventionnels utilisés et en fonction des étalons (Clément & Vidament, 1998).

Il a également été montré que l'intervalle optimum entre l'insémination et l'ovulation évolue en fonction du type de semence utilisé. Il est compris entre 24 et 72 heures lors d'utilisation de semence fertile (Woods *et al.*, 1990) et inférieur à 24 heures lorsque la semence est subfertile (Batellier *et al.*, 1997).

Le nombre d'inséminations réalisées sur une même chaleur influence également la fertilité. Plusieurs auteurs ont montré que lorsque au moins 2 inséminations sont mises en place au cours d'un même œstrus, la fertilité est améliorée et ce quel que soit le type de semence utilisé (Voss *et al.*, 1982 ; Vidament *et al.*, 1987 ; Batellier *et al.*, 1997).

Rapidement après l'insémination (4 à 6 heures), une population de spermatozoïdes mobiles et morphologiquement normaux adhère à l'épithélium de l'oviducte. Ce stockage va permettre une immobilisation des spermatozoïdes, un maintien de la vitalité et un retardement de la capacitation. La capacitation se définit comme un ensemble de modifications structurales et biochimiques au niveau du spermatozoïde permettant la fixation des spermatozoïdes à la zone pellucide de l'ovocyte déclenchant ainsi la réaction acrosomique et la fécondation (Dobriniski *et al.*, 1997). La capacitation se produit dès le décrochage des spermatozoïdes des cellules épithéliales provoqué par l'imminence de l'ovulation (Scott *et al.*, 2000).

Suite à ces constatations, il était intéressant de tenter d'appréhender les mécanismes mis en jeu lors d'inséminations multiples. En utilisant de la semence d'étalons différents pour mettre en évidence l'insémination réellement fécondante avec différents types de semence.

## II - QUELLE EST L'INSÉMINATION FÉCONDANTE LORS D'INSÉMINATIONS RÉPÉTÉES AU COURS DU CYCLE AVEC DE LA SEMENCE FERTILE ? (Le Pin 1997, Clément *et al.*, 2000)

Cette première étude visait à déterminer le moment de l'insémination fécondante lorsque au moins deux inséminations de semence fraîche utilisée immédiatement après la récolte (semence fertile) étaient réalisées sur une même chaleur. Des juments en chaleur présentant au moins un follicule de 30mm ont été inséminées ( $200 \cdot 10^6$  spz/doses) toutes les 48 heures avec de la semence d'étalons différents jusqu'à ovulation avec un maximum de 3 inséminations. Les embryons ainsi obtenus ont été collectés 10 à 12 jours après l'ovulation constatée et la paternité a été déterminée par typage ADN (Guérand *et al.*, 1996). Sur les 23 embryons testés, 17 provenaient de cycles à 2 inséminations et 6 de cycles à 3 inséminations. Seulement 30% de ces embryons étaient issus de l'insémination la plus proche de l'ovulation. L'intervalle moyen entre l'insémination fécondante et l'ovulation était de  $2,6 \pm 1,1$  jours et ne différait pas entre les cycles à 2 ou 3 inséminations.

La conclusion des auteurs était que dans le cas d'utilisation de semence fertile, 3 à 4 jours semblent correspondre à la durée de stockage des spermatozoïdes dans l'isthme de l'oviducte. En effet, c'est la semence issue des inséminations réalisées 3 à 4 jours avant l'ovulation qui féconde majoritairement par rapport à du sperme plus récent ou plus vieux.

### III - QUELLE EST L'INSÉMINATION FÉCONDANTE LORSQUE DEUX QUALITÉS DE SEMENCE SONT UTILISÉES AU COURS DU CYCLE (Chamberet ,1997)

Une étude similaire a ensuite été menée à la station expérimentale de Chamberet.

#### • Suivi des juments et répartition en lots

La croissance folliculaire des juments en chaleur était suivie par échographie et dès visualisation d'un follicule de 32 mm les juments étaient réparties en deux lots : soit le lot « subfertile-fertile », soit le lot « fertile-subfertile ». Dans chacun des lots les juments étaient inséminées deux fois à 24h d'intervalle avec de la semence de deux étalons différents. Dans le lot « subfertile-fertile », la première insémination était réalisée avec de la semence conservée à 4°C pendant 24h et la seconde avec de la semence fraîche inséminée immédiatement après la collecte. Les deux types d'inséminations étaient inversés dans les cycles du lot « fertile-subfertile ». L'ovulation était induite par injection de 1500 UI hCG (human Chorionique Gonadotropine) en intraveineuse (Chorulon®, Intervet, Angers, France) sur les juments présentant un follicule de 35 mm minimum et en croissance, le jour de l'insémination en semence fertile quel que soit le type de cycle.

#### *Figure I*

L'objectif de cette étude était d'estimer l'apport d'une insémination de semence subfertile placée 24h avant ou 24h après une insémination de semence fertile, toujours placée 48h avant l'ovulation. La semence fertile était de la semence fraîche utilisée immédiatement après la collecte. La semence subfertile était de la semence conservée 24 heures à 4°C dans du lait.

#### • Préparation de la semence

##### Semence fertile

Immédiatement après la récolte, la semence était filtrée. La concentration de l'éjaculat était déterminée à l'aide d'un colorimètre et la semence était diluée à  $20 \cdot 10^6$  spz/ml dans du lait demi-écrémé additionné d'antibiotiques (pénicilline, gentamicine). Les juments étaient inséminées immédiatement avec  $100 \cdot 10^6$  spz.

##### Semence subfertile

La préparation de la semence était identique à celle de la semence fertile. Les doses de  $100 \cdot 10^6$  spz ainsi réalisées étaient conservées à 4°C pendant 24h.

#### • Détermination de la paternité

La paternité était déterminée par test ADN sur les poulains vivants ou pour trois cas sur les avortons ou poulains morts nés.

#### • Résultats

Le tableau 1 présente la fertilité par cycle et le pourcentage d'embryons par ovulation pour les 2 types de cycles.

Bien qu'une tendance favorable au cycle « fertile-subfertile » ait été observée cette différence de pourcentage d'embryons par ovulation n'est pas significative. La figure II présente le pourcentage d'embryons par ovulation pour chaque insémination.

Le nombre d'ovulations a été ajusté pour tenir compte des avortements non testés en paternité (avortons perdus). On note que la majorité des embryons est issue de l'insémination avec la semence fertile quel que soit le type de cycle. Bien que la différence ne soit pas significative, on observe une diminution du pourcentage d'embryons par ovulation lors d'inséminations avec de la semence fertile lorsque celle-ci est précédée d'une IA en semence réfrigérée.

#### IV. QUELLE EST L'INSÉMINATION FÉCONDANTE EN SEMENCES FERTILE (Le Pin 1999) ET SUBFERTILE (Le Pin 2000) ?

Suite à ces études la question de la durée optimale entre IA et ovulation n'était pas totalement élucidée. Nous ne possédions pas non plus de données quant au mécanisme mis en jeu lors d'inséminations multiples avec de la semence subfertile uniquement. C'est pourquoi deux études ont été réalisées à la Jumenterie du Pin avec pour objectif de préciser quelle était l'insémination fécondante dans le cas d'inséminations doubles sur une même chaleur, en utilisant de la semence fertile d'une part (étude 1) ou de la semence subfertile d'autre part (étude 2).

Ces deux études étaient basées sur le protocole suivant :

- **Suivi des juments et répartition en lots**

La croissance folliculaire des juments en chaleur était suivie par échographie afin de les répartir en deux lots en fonction de la taille des follicules observés : les juments étaient inséminées deux fois à 48h d'intervalle avec de la semence de deux étalons différents dès visualisation d'un follicule de 33 mm (groupe A) ou d'un follicule de 30 mm (Groupe B). L'ovulation était induite par injection de 1500 UI d'hCG en intraveineuse (Chorulon®, Intervet, Angers, France) quand les juments présentaient un follicule de 35 mm minimum et en croissance, soit le jour entre les deux inséminations (Groupe A), soit le jour de la deuxième insémination (Groupe B), ceci dans le but d'obtenir des intervalles IA-ovulation allant de 24 à 96 heures.

Pour chacune des études, la semence de trois étalons était utilisée. Ces étalons étaient différents entre les deux études.

- **Préparation de la semence**

*Etude 1 : semence fertile (fraîche)*

Immédiatement après la récolte, la semence était filtrée et diluée au tiers dans du lait demi-écrémé. La concentration de ce mélange était ensuite évaluée par comptage à la cellule hématimétrique, et ajustée à  $20 \cdot 10^6$  de spermatozoïdes par ml avec du lait demi-écrémé. Les juments étaient inséminées immédiatement avec  $200 \cdot 10^6$  de spz totaux.

*Etude 2 : semence subfertile (conservée)*

La préparation de la semence était identique à celle décrite pour l'étude 1 mise à part que le lait demi-écrémé était additionné d'antibiotiques. Les doses de  $200 \cdot 10^6$  spz totaux ainsi réalisées étaient conservées à 4°C pendant 24h, jusqu'à l'insémination des juments.

- **Détermination de la paternité**

Les juments étaient échographiées quotidiennement à partir du onzième jour après l'ovulation constatée, et dès visualisation, la vésicule embryonnaire était collectée par siphonnage de l'utérus. Les embryons ainsi collectés étaient rincés dans du sérum physiologique et conservés à -20°C jusqu'à analyse. La paternité des embryons était déterminée à LABOGENA par typage ADN.

- **Résultats**

Le tableau 2 présente les fertilités par cycle et les pourcentages d'embryons par ovulation dans les deux études. Bien qu'aucune différence significative ne soit observée, on note une tendance toujours favorable au groupe A par rapport au groupe B quel que soit le type de semence.

En ce qui concerne l'insémination fécondante, la figure IV représente les pourcentages d'embryons par ovulation et pour chaque insémination. Lors de l'utilisation de semence fertile (étude1), ce taux est identique entre 24 et 72h puis chute significativement à 96h ( $P < 0,05$ ). Par contre lorsque la semence est subfertile (étude2), ce taux diminue proportionnellement à l'augmentation de l'intervalle insémination-ovulation.

Le pourcentage d'embryons par ovulation et par étalon pour chaque insémination (figure V), montre que lors de l'utilisation de semence conservée, on observe un fort effet étalon puisqu'un étalon a produit à lui seul la

totalité des embryons issus de la première IA des groupes A et B. Ce phénomène n'est pas observé dans l'étude 1 en semence fraîche.

Il faut noter que dans deux cas (un dans chaque étude) des embryons jumeaux issus d'étalons différents ont été obtenus. Dans les autres cas (n=10), les gestations gémellaires étaient issues du même étalon donc de la même insémination.

## V - CONCLUSION

Ces travaux confirment l'observation faite par Clément et collaborateurs en 1997, à savoir qu'en cas d'inséminations multiples avec de la semence fraîche, l'insémination fécondante n'est pas toujours l'insémination la plus proche de l'ovulation. Nous montrons également que cette observation est vérifiée lors de l'utilisation de semence conservée à 4°C pendant 24h. Une autre étude conduite à la Jumenterie du Pin (non publiée) amène à la même conclusion avec de la semence congelée.

Par contre, la probabilité de fécondation avec de la semence fraîche est la même que la semence soit conservée de 24 à 72 heures dans le tractus génital de la jument, contrairement aux observations de Clément et collaborateurs qui montraient une augmentation de cette probabilité jusqu'à 72-96h. Dans la mesure où notre étude a été faite sur plus d'embryons, elle apparaît plus valide. De plus elle corrobore les données antérieures de maintien du pouvoir fécondant dans les voies génitales entre 0 et 72h, sans qu'aucune observation d'un pic de fertilité n'ait été signalée dans cette période (Woods *et al.*, 1990). La perte de pouvoir fécondant observée à 96 heures peut être expliquée par la perte de mobilité flagellaire au quatrième jour de stockage et par le décrochage progressif des spermatozoïdes de l'épithélium de l'oviducte après 4 jours observés *in vitro* par Ellington *et al* (1993).

La diminution progressive du pouvoir fécondant de la semence subfertile dans les voies génitales suggère que le relargage progressif des spermatozoïdes par l'oviducte soit plus précoce qu'avec de la semence fertile ou que la capacité de fixation des spermatozoïdes aux cellules épithéliales est plus faible comme l'ont observé Dobrinski et collaborateurs en 1995 avec de la semence congelée.

Lorsque les deux types de semence sont utilisés sur un même cycle, la semence fraîche est majoritairement fécondante. Scott et collaborateurs en 2000 estiment que lorsque de la semence est subfertile, le nombre de spermatozoïdes qui passent la jonction utérutubaire est plus faible, la semence réfrigérée se trouve donc en concurrence avec un nombre plus important de spermatozoïdes « frais ».

La faculté des spermatozoïdes à parvenir jusqu'à l'oviducte, à y survivre et à féconder semble fournir à chaque insémination son propre potentiel fécondant. Des inséminations répétées conduiraient à un cumul (non arithmétique) de ces potentiels fécondants.

En pratique, dans l'état actuel de nos connaissances, pour bénéficier de cet effet, il convient d'inséminer au moins deux fois sur le cycle. En semence fraîche, les 2 inséminations doivent être faites dans la période 24 à 72h avant ovulation. Avec de la semence conservée, les 2 inséminations doivent être faites dans la période 24 à 48h avant l'ovulation.

Les résultats obtenus soulignent bien le potentiel fécondant différent entre étalons et l'effet de la manipulation de la semence sur sa longévité dans les voies génitales femelles.

## VI - BIBLIOGRAPHIE

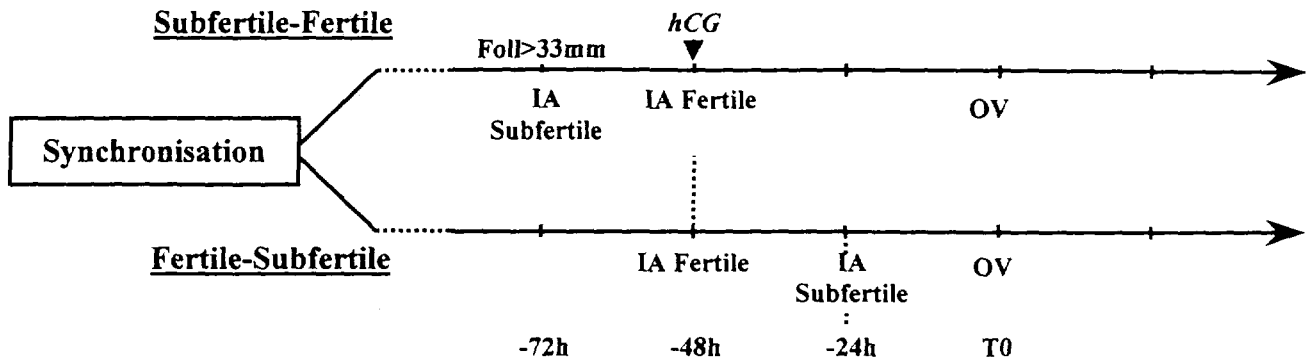
Batellier F., Duchamp G., Yvon J.M., Vidament M., Arnaud G., Mouysset C., Vincent P., Palmer E. and Magistrini M. (1997) Mise au point d'un dilueur chimiquement défini pour l'insémination artificielle immédiate et différée. CR 23<sup>e</sup> journée de la recherche équine, INA Paris ; 97-105.

Clément F. et Vidament M. (1998) Facteurs influençant la fertilité des étalons nationaux. Le point vétérinaire, vol. 29, 123,47-51.

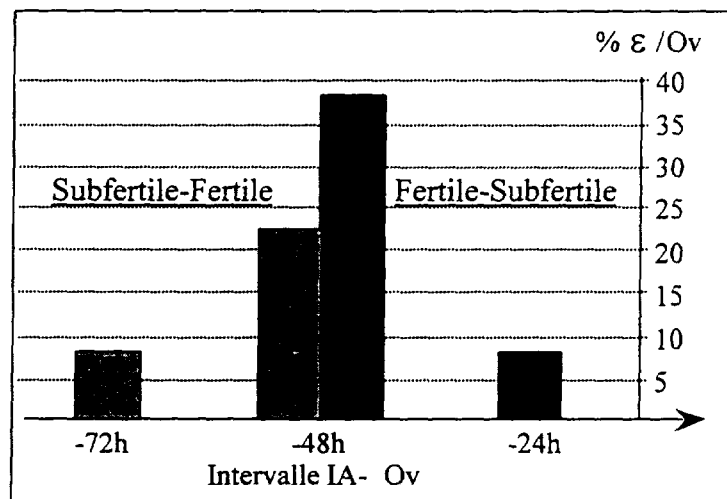
Clément F., Vincent P., Mahla R., Meriaux J.C. and Palmer E.(2000) Which insemination fertilizes when several successive inseminations are performed before ovulation? J. Reprod. Fertil. Suppl., 56 : 579-586.

- Dobrinski I., Thomas P.G.A. and Ball B.A. (1995) Cryopreservation reduces the ability of equine spermatozoa to attach to oviductal epithelial cells and zonae pellucidae in vitro. *J. of Andrology*, vol.16, N°6: 536-542
- Dobrinski I., Smith T.T., Suarez S.S. and Ball B.A. (1997) Membrane contact with oviductal epithelium modulates the intracellular calcium concentration of equine spermatozoa in vitro. *Biol Reprod.* ; 56(4) : 861-869.
- Ellington J.E., Ignatz G.G., Varner D.D., Marcucio R.S., Mathison P., and Ball B.A. (1993). In vitro interaction between oviduct epithelia and equine sperm. *Arch. Androl.*, 31:79-86.
- Guérand M., Mahla R., Lagneaux D., Amigues Y., Palmer E., and Bezaud J. (1997) Paternity testing of equine embryos by PCR amplified microsatellites analysis. *Equine Vet. J., Suppl. 25* : 69-71.
- Scott M.A. (2000) A glimpse at sperm function in vivo : sperm transport and epithelial interaction in the female reproductive tract. *Anim. Reprod. Science* 60-61 : 337-348
- Vidament M., Dupéré A.M., Julienne P., Evain A., Noue P., and Palmer E. (1987) Equine frozen semen : freezability and fertility fields results. *Theriogenology* 48 : 907-917.
- Voss J.L., Squires E.L., Pickett B.W, Shideler R.K., and Eikenberry D.J. (1982) Effect of number and frequency of inseminations on fertility of mares. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 32 : 53-57.
- Woods J, Bergfelt D.R., and Ginther O.J. (1990) Effects of time of insemination relative to ovulation on pregnancy rate and embryonic loss rate in mares. *Equine Vet. J.* 22 : 410-415.

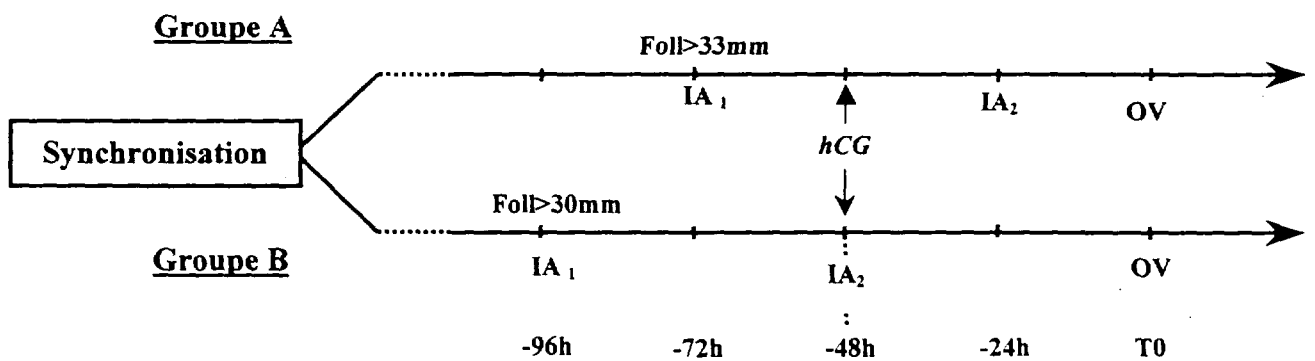
**Figure I**  
Schéma expérimental de l'étude menée à Chamberet



**Figure II**  
Pourcentage d'embryons par ovulation pour chaque insémination (Chamberet 1997)



**Figure III**  
Schéma expérimental des études menées à la Jumenterie du Pin



**Tableau 1**  
 Pourcentage d'embryon par ovulation et fertilité par cycle (Chamberet 1997)

	% d'ε / ovulation (nb ovulations)	Fertilité/cycle (nb cycles)
Fertile-Subfertile	46 % (37)	66% (35)
Subfertile-Fertile	29 % (31)	37% (30)

ns=différence non significative

**Tableau 2**  
 Pourcentage d'embryons par ovulation et fertilité par cycle  
 des deux études menées à la jumenterie du Pin

	% d'ε / ovulation (nb ovulations)		Fertilité/cycle (nb cycles)	
	Groupe A	Groupe B	Groupe A	Groupe B
Etude 1: semence fertile	74 % (34)	57% (30)	82% (23)	61% (26)
Etude 2: semence subfertile	38 % (40)	28 % (40)	37% (30)	35% (26)

ns=différence non significative

**Figure IV**  
 Pourcentages d'embryons par ovulation et pour chaque insémination dans les  
 deux études menées à la jumenterie du Pin

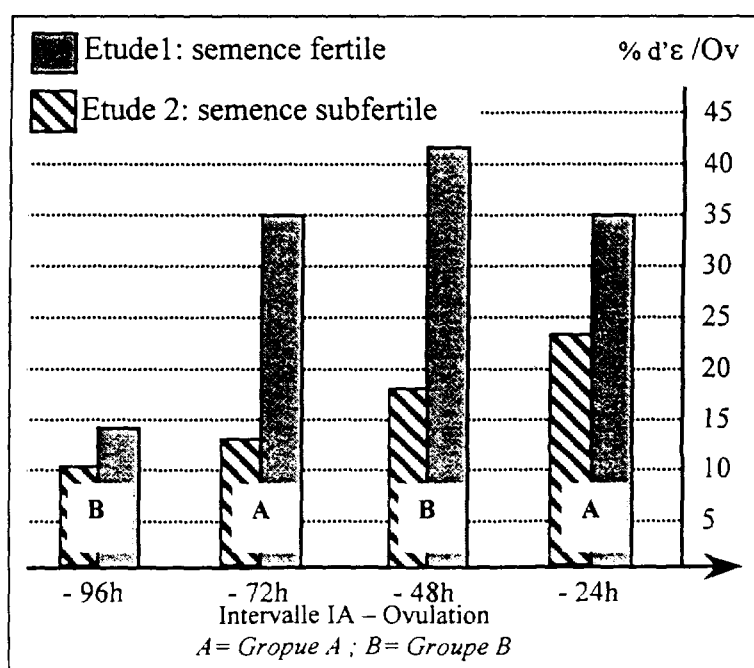




Figure V

Pourcentage d'embryons par ovulation et par étalon

