

## INSÉMINATION ARTIFICIELLE INTRATUBAIRE CHEZ LA TRUIE

M. COUROT (1), J. BUSSIÈRE (2), G. BERTAUD (2), O. BRACONNIER, (2) Y. FORGERIT (2), P. DESPRÉS (1),  
Françoise MARTINAT-BOTTÉ (1)

*Institut National de la Recherche Agronomique,*

*(1) Station de Physiologie de la Reproduction - 37380 Nouzilly*

*(2) Station Expérimentale d'Insémination Artificielle - 86480 Rouillé*

Ce travail présente une technique d'insémination artificielle chirurgicale chez la truie, à laquelle on doit recourir lorsque le nombre de spermatozoïdes disponibles est très limité, quelques dizaines de millions/IA. Les chaleurs des femelles sont synchronisées par un traitement progestatif : Régumate, 20mg/jour/truie pendant 18 jours. Certaines truies ont reçu une injection de 500 UI d'hCG à J4-16h (J0 = dernier jour de Régumate) pour mieux maîtriser le début des ovulations. Toutes les truies sont inséminées sous anesthésie générale légère à J6, entre 10 et 15h : la partie haute des cornes utérines est extériorisée par laparatomie. L'extrémité émoussée d'une aiguille d'injection est introduite successivement dans chaque corne, poussée -par la lumière de la jonction uterotubaire- dans les premiers centimètres de la lumière de l'oviducte. Les spermatozoïdes sont déposés à cet endroit à l'aide d'une seringue contenant le volume nécessaire de semence, 20-500µl, suivi d'un très petit volume d'air. Dans ces conditions, a) le taux de truies dont l'ovulation est en cours au moment de l'IA est de 85% (contre 37% pour celles qui n'ont pas reçu d'hCG); b) avec 6 à 80x10<sup>6</sup> Spz/truie, le taux moyen de mise-bas est de 59%. Cette technique assez lourde, dont les résultats sont encore modestes, peut cependant être utilisée pour des objectifs précis, lorsque le nombre de spermatozoïdes disponibles est limité.

### **Intratubal insemination in the pig**

The objective of this study was to develop a method for artificial insemination in the pig with a very small number of spermatozoa (6-80x10<sup>6</sup>/female). Oestrus of post-pubertal crossbred or Meishan gilts was synchronized by Regumate treatment at feeding (18 days; 20mg/day/female), day zero being the last day of Regumate administration. Gilts received 500 IU hCG at 4pm on D4 to improve the synchrony of ovulations. Insemination was performed under general halothane anesthesia on D6, between 10am and 3pm, ie 42 to 48h after hCG treatment. After midventral laparotomy, the distal parts of the uterine horns were exposed; 20-500µl of diluted semen was injected into each oviduct through a 1mm blunt tipped needle inserted into the top of the uterine horn and passed through the utero-tubal junction and 2-3cm into the tubal lumen. Following this protocol, a) ovulation was initiated at the time of surgical AI in 85% of gilts; b) the farrowing rate after AI was 59%. In spite of these modest results, this particular method of porcine AI can be used in specific conditions, when only a small number of spermatozoa is available.

## INTRODUCTION

Pour des raisons physiologiques et techniques propres à l'espèce, l'insémination artificielle porcine nécessite des doses de semence contenant un nombre élevé de spermatozoïdes, 2,5 à 3 milliards/dose, dilués dans un grand volume de milieu protecteur, 80 à 100ml (PAQUIGNON et al 1988). Dans ces conditions et lorsqu'elle est utilisée sur des truies sans problème de reproduction, l'insémination artificielle porcine donne de bons résultats de fertilité et de prolificité. Cependant, on peut, pour des raisons impérieuses, ne disposer que de très faibles quantités de spermatozoïdes, incompatibles avec les techniques normales d'insémination. Il faut alors faire appel à un procédé, déjà mis en oeuvre chez les porcins (POLGE et al, 1970; HUNTER, 1973; JOHNSON et PURSEL, 1973), qui consiste à déposer un tout petit nombre de spermatozoïdes dans la partie haute des voies génitales de la truie, supprimant ainsi la plupart des causes de pertes de gamètes mâles au long du tractus génital de la femelle, dont le passage très critique entre le haut des cornes utérines et les oviductes (POLGE et al, 1970).

Ce bref rapport présente les résultats obtenus dans des conditions où, pour des raisons expérimentales, nous devions féconder des truies avec un nombre réduit de spermatozoïdes.

## 1. MATÉRIEL

### 1.1. Animaux.

Les verrats donneurs de semence appartenaient aux différents génotypes présents au Centre INRA de ROUILLÉ (SEIA). Ils étaient récoltés selon le rythme normal du Centre. Les femelles étaient des cochettes pubères croisées (n=53) ou MEISHAN (n=14).

### 1.2. Semence.

Elle était préparée dans les quelques heures qui précédaient les inséminations :

#### 1.2.1. Expérience 1.

Des doses ordinaires de semence ( $3 \times 10^9$  spz dans 85ml de BTS) étaient concentrées par centrifugation (<1500g, 20min); le culot de spermatozoïdes était remis en suspension dans du BTS à raison de 100 à  $200 \times 10^6$  spz/ml.

#### 1.2.2. Expérience 2.

D'autres doses ont été préparées dans le cadre d'un protocole d'essai d'intégration d'ADN étranger dans des spermatozoïdes (GANDOLFI et al, 1989) : lavage de l'éjaculat avec le milieu TALP; incubation des gamètes en présence de l'ADN; nouveau lavage; ajustement de la dilution (TALP avec calcium) pour avoir 50 à  $100 \times 10^6$  spz/ml de milieu.

### 1.3. Synchronisation des femelles.

Les chaleurs des cochettes ont été synchronisées par un progestagène, le Régumate, 20mg/jour/truie, administré pendant 18 jours (MARTINAT-BOTTÉ et al, 1989). Afin de tester la possibilité de mieux maîtriser le début des ovulations, une

partie des femelles de la 1ère expérience a reçu 500 UI d'hCG (n=18) en injection intramusculaire à J4-16h (J0 = dernier jour d'administration du Régumate). Toutes les cochettes de la 2ème expérience ont reçu cette même dose d'hCG à J4-16h. Les chaleurs ont été détectées à l'aide d'un verrat, matin et soir de J3 à J6.

### 1.4. Inséminations chirurgicales.

Elles ont été faites à J6, entre 10 et 15h, pour se situer quelques heures après le temps moyen du début des ovulations (JOHNSON, 1991).

#### 1.4.1. Anesthésie.

Après un jeun complet (eau et nourriture) de 24h, les femelles étaient anesthésiées par l'injection intraveineuse d'une solution de Nesdonal (1g dans 20ml de serum physiologique) en quantité nécessaire pour provoquer le decubitus. Elle était suivie de l'administration continue, à l'aide d'un masque respiratoire, d'un mélange de fluothane et d'oxygène (environ 4 à 5% de fluothane).

#### 1.4.2. Inséminations.

Ouverture abdominale médiane au niveau des dernières tétines; observation des ovaires pour vérifier l'ovulation; extériorisation du haut des cornes utérines; perforation de la première corne à quelques centimètres de la jonction uterotubaire; passage, par la lumière de la corne et jusqu'à 2-3cm à l'intérieur de l'oviducte, d'une aiguille à pointe émoussée montée sur une seringue de 1ml, graduée au 1/100, contenant les spermatozoïdes; dépôt de la dose de semence dans la lumière de l'oviducte : 3 à  $40 \times 10^6$  spz dans un volume de 20 à 500 $\mu$ l, selon le taux de dilution et les expériences; même intervention sur le deuxième coté; remise en place des organes et suture de la paroi abdominale.

### 1.5. Contrôle des résultats.

Selon les expériences, les truies ont été abattues 4, 5 ou 11 jours après l'insémination, d'autres ont poursuivi leur gestation jusqu'au terme. Dans le premier cas, les embryons étaient récupérés par perfusion de l'utérus; leur nombre était comparé à celui des corps jaunes et leur développement était observé sous microscope. Dans le second cas, une échographie était pratiquée entre 21 et 25 jours après l'insémination et on notait le nombre et la viabilité des porcelets au moment de la naissance.

## 2. RÉSULTATS

### 2.1. Chaleurs et ovulations.

90% des cochettes sont venues en chaleurs dans les délais prévus, entre J3 et J6; 89% l'étaient encore le matin du jour de l'insémination (J6). L'injection de 500 UI d'hCG à J4-16h a permis d'avancer les ovulations, sans en changer le nombre, puisque celles-ci avaient commencé chez 89% des truies traitées (16/18; 16,4 ovulations/♀) contre seulement 37% chez celles qui ne l'avaient pas été (6/16; 16,3 ovulations/♀). Dans l'expérience 2, où toutes les femelles avaient reçu hCG, 81% d'entre elles (17/21) avaient ovulé ou étaient en cours d'ovulation au moment de l'insémination (tableau 1).

**Tableau 1** - Effet d'hCG sur le moment d'ovulation de cochettes traitées par du Régumate (a)

hCG dose (b)	nombre de cochettes	Ovulation à J6(c)	
		pas commencée	en cours ou terminée
<b>Expérience 1</b> 0 500	16	63% (10)	37% (6)
	18	11% (2)	89% (16)
<b>Expérience 2</b> 500	21	19% (4)	81% (17)
<b>Total hCG</b>	39	15% (6)	85% (33)

(a): J0 = dernier jour d'administration du Régumate (20mg/jour/femelle pendant 18 jours)

(b): injection IM de 500 UI d'hCG à J4-16h; «0» = pas d'hCG

(c): J6 = jour de l'insémination intratubaire; ( ) = nombre de femelles

## 2.2. Fertilité.

Dans les conditions de ce travail, le taux moyen de cochettes ayant des oeufs fécondés 4 ou 11 jours après l'insémination (Expérience 1), s'établit à 92%. Celles chez qui des oeufs non fécondés et/ou des embryons ont pu être récupérés avaient en moyenne 9,1 embryons dont 91,5% étaient à un stade normal de développement. La fertilité ne semble pas dépendre

du nombre de spermatozoïdes déposés dans l'oviducte. Dans l'expérience 2, où la gestation a pu se développer, 65% des cochettes étaient gravides (contrôle échographique) entre 21 et 25 jours après l'insémination. Le taux moyen de mise-bas a été de 59% et la prolificité a varié selon les truies de 2 à 13 (moyenne = 6,3), sans que les différences soient significatives entre génotypes (effectifs trop faibles) (tableau 2). Les porcelets nés vivants se sont développés normalement.

**Tableau 2** - Fertilité des cochettes inséminées chirurgicalement par voie intratubaire

Expérience 1 (a)	cochettes			prolificité nb/♀ extrêmes
	inséminées	récup. embryons entre G4 et G11	fécondées % (nb)	
	28	25	92% (23)	9,1 (2 à 17)
Expérience 2 (b)	cochettes			prolificité nb/♀ extrêmes
	inséminées génotype	échogr. positive % (nb)	mise bas % (nb)	
	<b>Croisées</b>	20 65% (13)	55% (11)	8,4 (4 à 13)
<b>Meishan</b>	14 64% (9)	64% (9)	4,7 (2 à 7)	
<b>Total</b>	34	65% (22)	59% (20)	6,3 (2 à 13)

(a) femelles croisées; 6 à 80x10<sup>6</sup> spz/femelle

(b) femelles croisées et Meishan; 10x10<sup>6</sup>spz/femelle

## 3. DISCUSSION

Ce travail montre qu'il est possible de féconder des truies, par insémination chirurgicale intratubaire, avec un nombre réduit de spermatozoïdes et d'obtenir ainsi des porcelets normaux. Cette méthode de reproduction est donc utilisable. En particulier, elle permet le recours à l'insémination artificielle dans des conditions particulières comme l'introduction de génotypes nouveaux dans un élevage à partir d'un nombre limité de

doses de semence. Toutefois, les taux de mises bas que nous avons observés sont modestes. Il convient de rappeler que nous avons mis en oeuvre cette méthode dans le cadre de travaux expérimentaux sur les spermatozoïdes du verrat où, par suite des traitements que nous imposions à la semence, celle-ci n'était plus de très bonne qualité au moment même de l'insémination. Peut être est-ce la raison de la différence notable qui est notée entre le taux relativement élevé de fécondation et celui, nettement moins bon, des mises bas. Il

est permis de penser que de meilleurs spermatozoïdes auraient donné des taux de mises bas plus élevés.

Nos résultats confirment ceux déjà obtenus par d'autres auteurs sur les seuls taux de fécondation observés quelques heures ou quelques jours après l'insémination d'un nombre comparable de gamètes (POLGE et al, 1970; HUNTER, 1973; JOHNSON & PURSEL, 1973) ou sur les taux de mises bas après insémination d'un très petit nombre de spermatozoïdes qui avaient été l'objet de traitements expérimentaux ( $0,6 \times 10^6$  spz/truie; JOHNSON 1991).

Le moment de l'insémination par rapport à celui des ovulations est crucial pour les résultats de fertilité (HUNTER et DZIUK, 1968). En conditions classiques, il doit se situer le plus près possible du début des ovulations (WABERSKI et al, 1994). C'est probablement plus important encore pour des inséminations intratubaires réalisées, comme dans le cas présent, avec des spermatozoïdes «expérimentaux». C'est pour mieux maîtriser ce moment d'ovulation que les cochettes ont reçu 500 UI d'hCG, hormone qui groupe le début des ovulations de la truie 40 à 42h après l'injection

(DZIUK & POLGE 1962). Ce traitement avait aussi été utilisé par les autres auteurs lors des inséminations intratubaires (POLGE et al, 1970; JOHNSON & PURSEL, 1973; JOHNSON, 1991).

## CONCLUSION

L'insémination chirurgicale intratubaire de la truie permet d'obtenir des fécondations avec un nombre très réduit de spermatozoïdes, jusqu'à 6-10 millions par truie. Celles-ci donnent lieu au développement d'une gestation et à la naissance de porcelets normaux. Toutefois, si les taux de gestations observés sont modestes, 65% à 25 jours, ils permettent cependant d'envisager le recours à cette méthode de reproduction lorsque les conditions techniques l'imposent. Elle risque cependant de perdre une partie de son intérêt lorsque des méthodes plus complexes encore seront au point chez le porc comme la fécondation in vitro (NIWA, 1993) ou le «GIFT» (RATH et al, 1994) qui consiste en l'apport, chez une receveuse, de gamètes étrangers mâles et femelles dans le haut de l'oviducte.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- DZIUK P.J., POLGE C. 1962. *J. Reprod. Fert.*, 4, 207-208.
- GANDOLFI F., LAVITRANO M., CAMAIONI A., SPADAFORA C., SIRACUSA G., LAURIA A. 1989. *J. Reprod. Fert., Abstr. series 4*, Abst. No 16.
- HUNTER R.H.F. 1973. *J. Exp. Zool.*, 183, 57-64.
- HUNTER R.H.F., DZIUK P.J. 1968. *J. Reprod. Fert.*, 15, 199-208.
- JOHNSON L.A. 1991. *Reprod. Dom. Anim.*, 26, 309-314.
- JOHNSON L.A., PURSEL V.G. 1973. *J. Animal Science*, 37, 1207-1211.
- MARTINAT-BOTTÉ F., BARITEAU F., FORGERIT Y., MACAR C., MOREAU A., TERQUI M., SIGNORET J.P. 1989. *Journées Rech. Porcine en France*, 21, 125-128.
- NIWA K. 1993. *J. Reprod. Fert., Suppl.* 48, 49-59.
- PAQUIGNON M., BUSSIÈRE J., BARITEAU F. 1988. *INRA Productions Animales*, 1, 271-280.
- POLGE C., SALAMON S., WILMUT I. 1970. *Veterinary Record*, 87, 424-429.
- RATH D., JOHNSON L.A., WELCH G.R., NIEMANN H. 1994. *Theriogenology*, 41, 1173-1179.
- WABERSKI D., WEITZE K.F., LIETMANN C., LÜBBERT ZUR LAGE W., BORTOLOZZO F.P., WILLMEN T., PETZOLDT R. 1994. *Theriogenology*, 41, 1367-1377.