

Conservation de la semence ovine

X. DRUART, Y. GUÉRIN, J.-L. GATTI, J.-L. DACHEUX

INRA, UMR85 Physiologie de la Reproduction et des Comportements, F-37380 Nouzilly, France

CNRS, UMR6175 Physiologie de la Reproduction et des Comportements, F-37380 Nouzilly, France

Université François Rabelais de Tours, F-37041 Tours, France

Haras Nationaux, F-37380 Nouzilly, France

Courriel : Xavier.Druart@tours.inra.fr

L'insémination ovine à partir de semence fraîche conservée à 15°C permet la diffusion de la semence de béliers de haute qualité génétique et sanitaire avec une fertilité compatible avec les objectifs économiques des éleveurs. Cependant, elle impose de fortes contraintes techniques aux centres d'insémination du fait de la durée limitée du pouvoir fécondant de la semence. Des méthodes de conservation permettant une simplification de l'organisation de l'insémination et une meilleure valorisation des reproducteurs sont recherchées.

L'insémination ovine a débuté en France dans les années 70 avec la conception des méthodes de conservation de la semence et de synchronisation de l'oestrus (Colas 1984). La standardisation des procédures de production, de conservation de semence et d'insémination a permis leur application à grande échelle (Baril *et al* 1993, Guérin 1990). Les effectifs d'animaux inséminés ont augmenté progressivement jusqu'en 1998 pour se stabiliser depuis une dizaine d'années autour de 800 à 850 000 par an. L'insémination représente en 2007 43% du cheptel en races laitières et 4,3% en races allaitantes (Raoul *et al* 2008) soit, respectivement, 636 000 et 202 000 inséminations.

Les technologies développées dans le cadre de l'insémination ovine doivent tenir compte des spécificités de l'espèce ovine par rapport aux autres espèces. Contrairement aux bovins et aux caprins, l'insémination ovine repose principalement sur l'utilisation de la semence fraîche en raison de la faible fertilité de la semence congelée après IA cervicale. De plus, l'insémination avec la semence fraîche doit être réalisée dans les 10 h qui suivent la collecte pour obtenir une fertilité maximale. Ceci a des répercussions techniques et économiques sur les Centres d'Insémination Artificielle (CIA) ovins. La dispersion des élevages et leur éloignement vis-à-vis du CIA, en particulier en bassins allaitants, imposent une organisation du travail contraignante pour les CIA. C'est également une perte financière puisque certaines demandes, en particulier à l'export, ne peuvent être honorées du fait d'un éloignement trop important.

Une autre spécificité ovine est le dépôt de la semence au niveau vaginal ou excervical car l'anatomie du col de l'utérus de la brebis rend quasi impossible l'insémination transcervicale. Le col de l'utérus constituant une barrière sélective de la semence, l'obtention d'une bonne fertilité avec de la semence conservée nécessite actuellement de réaliser une insémination intra-utérine sous contrôle endoscopique en déposant directement la semence dans l'utérus. Cependant, le coût et la technicité requise pour l'IA intra-utérine ne permettent pas de l'appliquer en routine à de grands troupeaux. En effet la taille importante des troupeaux ovins conduit à la réalisation d'un nombre important d'inséminations dans un délai très court. Il est donc nécessaire de développer des méthodes de conservation de la semence sous forme liquide ou congelée permettant d'obtenir des résultats de fertilité acceptables avec une méthodologie d'insémination facile et rapide à mettre en œuvre. Après avoir décrit les différentes méthodes de conservation utilisées, les principaux facteurs associés à la qualité et à la fertilité de la semence après conservation seront listés.

1 / Conservation sous forme liquide

1.1 / Conservation dans le lait

Le lait entier ou écrémé est classiquement utilisé comme milieu de conservation de la semence de bélier. En effet, son pH (7) et son osmolarité (280 mOsm/kg) permettent la dilution

directe de la semence dans le lait. Toutefois, avant son utilisation, le lait entier doit être chauffé à 95°C pendant 10 min pour inactiver les enzymes toxiques, un complexe protéique toxique pour les spermatozoïdes. Au contraire, le lait UHT peut être utilisé sans traitement préalable, puisqu'il a déjà subi un traitement thermique.

Le lait est un milieu complexe riche en protéines et en glucides. La fraction protéique joue un rôle tampon contre des modifications du pH et assure une chélation des métaux lourds. En effet, des métaux comme le fer catalysent les réactions oxydatives et favorisent la peroxydation lipidique des membranes cellulaires. Le degré élevé d'insaturation des lipides membranaires des spermatozoïdes les rend particulièrement sensibles à l'oxydation. Sous réserve que son activité persiste après chauffage du lait, la lactoferrine, une protéine proche de la transferrine et présente en grande quantité dans le lait, pourrait protéger les spermatozoïdes de l'oxydation par chélation du fer. Il est à noter que cette protéine constitue également l'une des protéines majoritairement sécrétées dans le fluide épидидymaire chez le bélier et plusieurs espèces domestiques. Elle pourrait assurer un rôle de protection des spermatozoïdes au cours de la maturation et le stockage épидидymaire (Dacheux *et al* 1998).

Le fructose est la principale source énergétique des spermatozoïdes dans le plasma séminal. Cependant, en absence de fructose, les spermatozoïdes sont capables de métaboliser d'autres glucides. Les glucides du lait, principalement le lactose, permettent le maintien de

l'osmolarité et constituent une source énergétique pour les spermatozoïdes.

Le lait écrémé reconstitué à partir de poudre de lait pour consommation humaine est utilisé en France par les centres d'insémination artificielle ovins en raison de sa qualité, de son faible coût et de sa facilité d'utilisation. Le lait reconstitué est complété par des antibiotiques pour inhiber la prolifération bactérienne.

Les spermatozoïdes de bélier peuvent être conservés dans le lait à une température de 4°C ou 15°C jusqu'à une durée de 10 h sans perte du pouvoir fécondant. Cependant, la fertilité de la semence est meilleure après conservation à 15°C par rapport à 4°C (Colas 1984).

En France, les CIA réalisent la dilution de la semence dans le lait à une température initiale de 35°C puis effectuent un refroidissement progressif de la semence diluée jusqu'à 15°C. La semence diluée est ensuite mise en paillettes fines de 0,25 mL et stockée dans des récipients isothermes dont la température de 15°C est maintenue grâce à une ampoule de verre remplie d'acide acétique congelé. En effet, la température de fusion de 16,7°C de l'acide acétique est mise à profit pour maintenir simplement une température de 15°C pendant plusieurs heures dans un récipient isotherme. La semence peut ainsi être conservée à 15°C, aisément transportée et utilisée pour l'IA pendant les 10 h qui suivent la collecte. Cette méthode de conservation permet d'obtenir de bons résultats puisque la fertilité moyenne obtenue en France dans ces conditions se situe autour de 65% de mises bas pour des femelles adultes de race laitière ou allaitante (statistiques nationales 2003-2007, Raoul *et al* 2008).

1.2 / Conservation dans d'autres milieux

D'autres milieux que le lait peuvent être utilisés pour conserver la semence ovine. Ces milieux sont généralement constitués d'un tampon minéral ou organique associé à des glucides et du jaune d'œuf (JO).

Les milieux à base de phosphate ou de citrate permettent de conserver la semence ovine à 4°C et 15°C avec une fertilité variable selon les auteurs mais globalement similaire à celle du lait (Maxwell et Salamon 1993). Des molécules de type organique (Tris, Mops)

sont maintenant préférés aux tampons phosphates du fait de leur meilleur pouvoir tampon. Le tampon Tris associé à du glucose et du jaune d'œuf peut être une alternative au lait. Colas *et al* n'ont pas observé de différence de fertilité après IA avec de la semence conservée 4 h à 4°C avec du lait écrémé ou du Tris/JO (Colas 1984). La mobilité des spermatozoïdes de bélier après 24 h de conservation à 5°C dans des milieux lait écrémé/JO ou Tris/JO n'est pas significativement différente (Paulenz *et al* 2002). Dans ces conditions, la fertilité obtenue après IA vaginale sur estrus naturel dans une limite de 12 h de conservation à 5°C n'est pas différente entre le lait/JO et le tris/JO (Paulenz *et al* 2003). De même, après 24 h de conservation à 15°C, Hollinshead *et al* n'ont pas observé de différence significative de mobilité entre le lait UHT et le Tris/JO (Hollinshead *et al* 2004a). Le Mops est utilisé dans le RSD-1 (*Ram Semen Diluent*), un milieu de Krebs Ringer modifié par l'utilisation du Mops comme tampon à la place du bicarbonate (Upreti *et al* 1995). La mobilité est maintenue pendant 24 h à 15°C dans ce milieu mais la fertilité n'a pas été décrite (Upreti *et al* 1997, 1998).

2 / L'encapsulation

La réussite à l'IA est fortement conditionnée par la bonne synchronisation entre l'arrivée des spermatozoïdes dans l'oviducte et l'ovulation. L'ovulation est synchronisée chez les ovins par l'utilisation d'un traitement hormonal comprenant l'application pendant 12-14 j d'une éponge vaginale imprégnée d'un progestatif suivie d'une injection d'hormone gonadotrope (PMSG, *Pregnant Mare Serum Gonadotropin*) lors du retrait de l'éponge (Baril *et al* 1993). L'ovulation a lieu en moyenne 60 h après le retrait de l'éponge et l'IA est réalisée à un délai fixe de 55 h après le retrait de l'éponge. Cependant, la variabilité entre femelles du moment de l'ovulation entraîne une variabilité du délai entre l'insémination et l'ovulation. Pour pallier à ce problème, une solution pourrait consister à réaliser l'insémination avec de la semence conditionnée sous une forme permettant une libération progressive des spermatozoïdes dans les voies génitales femelles. Ceci pourrait être obtenu par la méthode d'encapsulation. L'encapsulation consiste à inclure des cellules dans des microbilles d'alginate, un polysaccharide polyanionique naturel extrait des

algues brunes (Uludag *et al* 2000). L'alginate est couramment utilisé pour former des hydrogels car il est non toxique et se dissout aisément dans les solutions aqueuses. Le principe de la microencapsulation consiste dans un premier temps à ajouter de l'alginate de sodium à une suspension de cellules. Puis ce mélange est projeté goutte à goutte dans une solution de chlorure de calcium. L'alginate est chargé négativement et gélifie en présence d'ions divalents tels que le Ca^{2+} et le Ba^{2+} . Les ions sodium contenus dans l'alginate de sodium sont alors déplacés par les ions calcium. L'alginate de sodium se transforme en alginate de calcium qui gélifie. Les microsphères formées doivent ensuite être stabilisées par une couche externe de poly-L-lysine. La technique d'encapsulation, appliquée aux spermatozoïdes depuis les années 80, permet de maintenir les spermatozoïdes vivants dans des sphères creuses (Nebel *et al* 1985). Lorsque les spermatozoïdes sont au préalable dilués dans des milieux adaptés à la congélation et à l'encapsulation, ils peuvent être congelés/décongelés sous une forme encapsulée.

La conservation à 18°C sous forme encapsulée de la semence porcine permet de préserver la mobilité, les activités enzymatiques et le pouvoir fécondant *in vitro* des spermatozoïdes (Vigo *et al* 2002, Faustini *et al* 2004). La semence bovine peut également être congelée sous forme de capsules et présente une qualité normale après décongélation. Cependant, la fertilité obtenue après insémination avec de la semence encapsulée n'est pas supérieure à celle obtenue par insémination conventionnelle avec de la semence congelée chez les bovins (Munkittrick *et al* 1992, Nebel *et al* 1996) et de la semence fraîche (5°C) chez les porcins (Huang *et al* 2005). Chez les ovins, cette méthode n'a pas non plus montré de supériorité par rapport aux méthodes classiques de conservation. La semence de bélier conservée à 5°C dans des billes d'alginate présente une fertilité équivalente à celle conservée sous forme liquide (Maxwell *et al* 1996).

Ces résultats pourraient s'expliquer par le fait que la libération progressive des spermatozoïdes *in vivo* à partir des capsules n'est pas effective. Une étude chez les porcins a montré que la libération des spermatozoïdes dans l'utérus intervenait dans les 3 à 6 h suivant l'insémination (Esbenshade et Nebel 1990). Les capsules possédant une composition standardisée, la libération

des spermatozoïdes pourrait être différée mais pas progressive.

Toutefois, la méthode initiale d'encapsulation avec l'alginate de sodium fait actuellement l'objet d'améliorations avec l'utilisation de nouveaux polymères (Weber *et al* 2004). Ces nouveaux polymères permettent à la fois d'améliorer la résistance mécanique des capsules et de mieux maîtriser leur dissolution. L'objectif est, à terme, de concevoir un mode de libération des spermatozoïdes plus spécifique et dépendant par exemple de modifications de l'environnement utérin au moment de l'ovulation. Ainsi un modèle de capsules à base de cellulose permet, *in vitro*, de conditionner la libération des spermatozoïdes des capsules à la présence de cellulase dans le milieu (Weber *et al* 2006). De plus, la commercialisation d'automates d'encapsulation à haut débit permet maintenant de tester rapidement de nouveaux protocoles et d'envisager l'intégration de l'encapsulation dans les procédures de production et de conditionnement de la semence des CIA lorsque l'encapsulation aura fourni les résultats attendus (Weber *et al* 2006).

3 / La congélation

De nombreuses méthodes de congélation de la semence ovine ont été proposées (Salamon et Maxwell 1995). Parmi celles-ci, deux protocoles principaux sont actuellement utilisés. Le protocole de congélation utilisé actuellement en France a été conçu par Guy Colas et ses collaborateurs (Colas 1975). Il comporte deux étapes successives de dilution. La première étape consiste tout d'abord à refroidir les spermatozoïdes à 4°C. Pour les protéger contre les effets délétères du refroidissement, les spermatozoïdes sont dilués dans un milieu lactose supplémenté de jaune d'œuf. La fraction lipidique du jaune d'œuf, et en particulier les lipoprotéines de type LDL, est reconnue pour assurer une stabilisation des membranes à basse température. La deuxième étape, dite de glycérolisation, consiste à inclure le cryoprotecteur, le glycérol, dans les spermatozoïdes pour leur permettre de supporter la congélation. Le glycérol étant toxique à 37°C pour les spermatozoïdes, cette étape est effectuée après le refroidissement des spermatozoïdes à 4°C, le glycérol étant apporté par un milieu lait/glycérol. Les spermatozoïdes sont ensuite conditionnés en paillettes fines de 0,25 mL, congelées dans des vapeurs d'azote et

stockées dans l'azote liquide à -196°C. Cette méthode en deux étapes permet de cumuler les effets protecteurs du lait, du jaune d'œuf et du glycérol.

Par ailleurs, d'autres auteurs proposent une méthode de congélation en une seule étape avec un milieu contenant un tampon de type zwitterion (Tes, Hepes, Pipes) contenant du glucose, du JO et du glycérol (Molinia *et al* 1994). La dilution est réalisée à 30°C pour limiter les effets négatifs du glycérol, avec une congélation en pastilles. La semence est congelée par dépôt dans des puits de glace carbonique à -80°C avant d'être plongée dans l'azote liquide puis stockée dans des tubes. Il a été possible par cette méthode de congeler/décongeler de la semence, de réaliser un tri des spermatozoïdes X/Y par cytométrie en flux, puis de recongeler/décongeler une deuxième fois la semence avant de réaliser une insémination intrautérine. La fertilité obtenue dans ces conditions est similaire à celle obtenue avec de la semence congelée dans des conditions témoin (Hollinshead *et al* 2003, 2004b).

4 / Facteurs influant la qualité et la fertilité de la semence après conservation

4.1 / La concentration

La concentration de la semence a un impact important sur la qualité de la semence lors de la conservation sous forme liquide. Dans les conditions d'IA, la semence est classiquement diluée à une concentration de 1,2-1,6 milliard de spermatozoïdes par mL pour obtenir un total de 300-400 millions de spermatozoïdes par paillette. Ce nombre de spermatozoïdes par dose permet d'obtenir une bonne fertilité dans un délai de 10 h après collecte. Cependant, une concentration trop élevée est préjudiciable pour la conservation de la semence puisque la fertilité après 24 h de conservation à 5°C est inférieure pour une concentration de 2.10^9 spz/mL par rapport à 1.10^9 spz/mL (Colas *et al* 1980). Une étude systématique de l'impact de la concentration sur la mobilité après 24 h de conservation dans le lait à 4°C a montré que la concentration optimale était égale à 800.10^6 spz/mL (Alencar de Araujo 2000). En revanche, une concentration plus élevée (1400.10^6 spz/mL) ou plus faible (400.10^6 spz/mL) diminue fortement la qualité de la semence (figure 1). Cependant, à

cette concentration de 800.10^6 spz/mL, le nombre de spermatozoïdes par dose (paillette de 0,25 mL) est de 200 millions, c'est-à-dire inférieur aux recommandations. Ceci oblige donc à inséminer avec un volume double. Hors il apparaît que la réussite à l'insémination est aussi dépendante d'un volume d'insémination réduit, sans doute en raison d'un reflux de la semence lié au volume inséminé. Il est donc nécessaire de trouver un compromis entre une concentration suffisamment élevée pour assurer un nombre minimal de spermatozoïdes dans un volume réduit et une concentration suffisamment faible pour limiter la baisse de qualité due à la conservation.

4.2 / Le degré d'oxydation

Au cours de la conservation, les spermatozoïdes produisent des superoxydes, en particulier le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 et l'ion superoxyde O_2^- (Aitken et Baker 2004, Chatterjee et Gagnon 2001). Ces superoxydes provoquent une diminution de la mobilité par l'inhibition de la production d'ATP par les mitochondries et une altération de la membrane plasmique par peroxydation des lipides membranaires. La supplémentation des milieux de conservation avec des antioxydants permet de limiter les effets négatifs des superoxydes (Maxwell et Stojanov 1996, Maxwell et Watson 1996). Une supplémentation de la semence avec des antioxydants de type enzymatique comme la superoxyde dismutase (SOD) et la catalase améliore la fertilité après insémination (Maxwell et Stojanov 1996). Toutefois, le coût et la fragilité de l'activité antioxydante de ces enzymes limitent leur utilisation, et des antioxydants non enzymatiques sont recherchés. Un analogue de la vitamine E, le TEMPOL, améliore la mobilité après 24 h de conservation à 15°C (Mara *et al* 2005). Les flavonoïdes sont des composés phénoliques présents en quantité importante chez de nombreux végétaux, comme le raisin, et présentent un fort pouvoir antioxydant. La mobilité de la semence conservée a ainsi été améliorée par le resveratrol après 24 h de conservation à 15°C chez le bélier (Sarlos *et al* 2002) et par la catéchine après 96 h de conservation à 15°C chez le bouc (Purdy *et al* 2004). Toutefois, si les antioxydants permettent d'améliorer la mobilité de la semence conservée sous forme liquide ou congelée, un impact positif des antioxydants sur la fertilité n'a pas pu être clairement démontré.

Figure 1. Impact de la concentration sur la survie des spermatozoïdes après 2 h et 24 h de conservation dans le lait à 4°C (d'après Alencar de Araujo 2000).

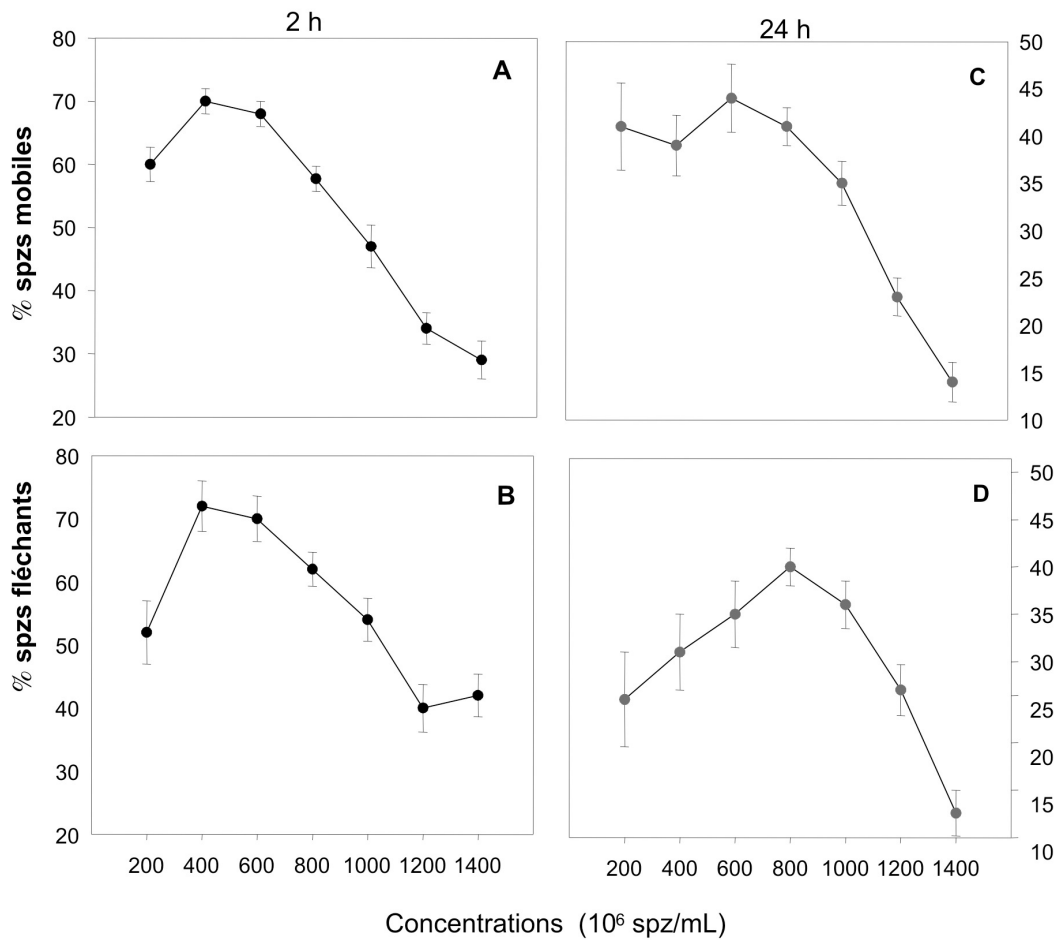
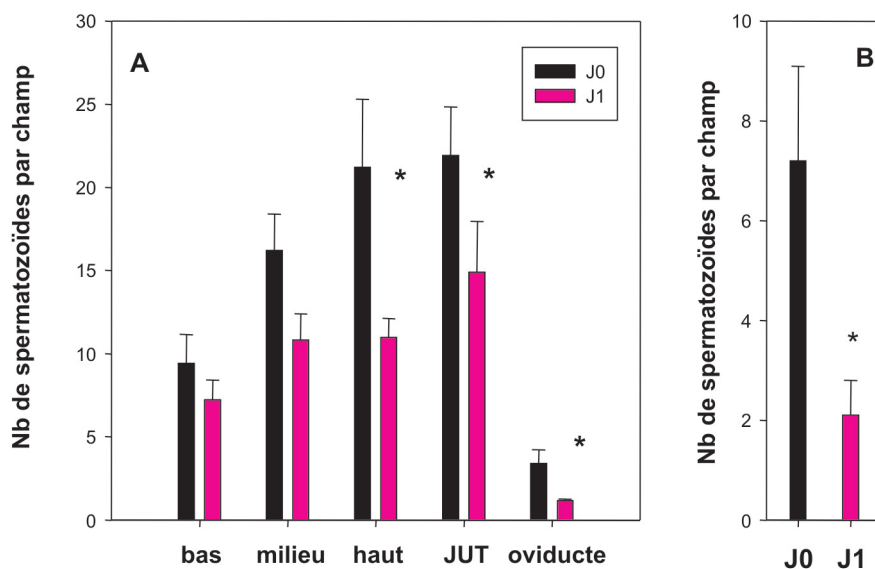


Figure 2. Impact de la conservation de la semence pendant 24 h à 15°C dans le lait sur le transit des spermatozoïdes dans le tractus génital femelle (D'après Druart et al 2008). Les spermatozoïdes sont inséminés puis comptés 4 h après insémination à différents niveaux du tractus par microscopie confocale fibrée.

A. Insémination intra-utérine au niveau du bas de chaque corne.
B. Insémination cervicale et comptage des spermatozoïdes dans l'utérus.



4.3 / Le transit dans les voies génitales femelles et la survie *in vivo*

En dépit de taux corrects de survie des spermatozoïdes à la décongélation (de l'ordre de 50%), la fertilité obtenue après IA cervicale avec de la semence congelée reste faible (10-20%). Seule la réalisation d'IA intra-utérine sous contrôle endoscopique permet d'obtenir des résultats permettant l'utilisation de la semence congelée en élevage (50-70%). Il apparaît donc que la congélation, en plus d'induire une mortalité cellulaire, diminue fortement l'aptitude des spermatozoïdes mobiles à traverser le col de l'utérus.

De même, la diminution modérée de la mobilité *in vitro* des spermatozoïdes après 24 h de conservation ne peut pas expliquer la forte diminution de fertilité observée après IA cervicale. Une fertilité équivalente à celle obtenue avec de la semence fraîche peut être obtenue après IA intra-utérine. Ainsi, le passage du cervix est fortement réduit après 24 h de conservation à 15°C et l'obser-

vation par imagerie *in vivo* des spermatozoïdes dans le tractus génital femelle montre que le nombre de spermatozoïdes atteignant l'oviducte est réduit et leur mobilité *in vivo* altérée (figure 2, Druart *et al* 2008).

Les données publiées par l'équipe norvégienne de Paulenz restent une exception avec une fertilité de l'ordre de 50-60% dans des conditions d'élevage après IA vaginale/cervicale avec de la semence congelée selon un protocole proche de celui de Colas *et al* (Paulenz *et al* 2004, 2005, 2007). Dans ces mêmes conditions d'élevage, la fertilité après 24 h de conservation à 15°C dans le lait est très proche de celle obtenue après 12 h de conservation (Paulenz *et al* 2009). Puisque la fertilité est élevée selon les deux modes de conservation (liquide et congelée) et que les protocoles sont proches de ceux classiquement utilisés par ailleurs, il ne semble pas que ces résultats puissent être expliqués par des différences méthodologiques de conditionnement de la semence. L'hypothèse d'une race

présentant une aptitude exceptionnelle quant à la facilité de transit des spermatozoïdes dans le cervix peut être posée. Ainsi, la race Belclare a montré une aptitude supérieure à la race Suffolk quant au transit des spermatozoïdes dans le col de l'utérus (Fair *et al* 2005). Par ailleurs, si l'impact de l'anatomie du col sur le transit des spermatozoïdes est mal connu, il apparaît qu'une variabilité de l'anatomie du col existe entre femelles et entre races (Kershaw *et al* 2005).

Conclusion

Les méthodes actuelles de conditionnement de la semence ovine sous forme liquide sont bien adaptées pour la réalisation des IA le jour de la collecte dans un secteur géographique réduit. Cependant, un allongement de la durée de conservation de la semence permettrait d'assouplir l'organisation des CIA et d'élargir la diffusion de la semence de béliers de haute valeur génétique. D'un point de vue méthodologique, une

meilleure connaissance des modifications subies par le spermatozoïde au cours de la conservation permettrait de mieux cibler les solutions techniques à apporter. En particulier, il semble que la production de superoxydes par le spermatozoïde et l'altération du métabolisme énergétique puissent être impliquées dans la perte du pouvoir fécondant. Si des approches ciblées avec des antioxydants n'ont pour l'instant pas fourni les résultats attendus, une approche plus systématique du métabolisme oxydatif et énergétique au cours de la conservation pourrait permettre de trouver des méthodes de protection adaptées. Par ailleurs il apparaît que l'interaction du spermatozoïde avec le tractus génital femelle, et en particulier le passage du col de l'utérus, est mal connue en dépit de son impact sur la fertilité de la semence conservée. Une meilleure compréhension des mécanismes biologiques impliqués dans le transit des spermatozoïdes pourrait permettre d'améliorer le transit de la semence conservée et donc son pouvoir fécondant.

Références

- Aitken R.J., Baker M.A., 2004. Oxidative stress and male reproductive biology. *Reprod. Fertil. Dev.*, 16, 581-588.
- Alencar de Araujo A., 2000. Mise au point d'un dilueur de conservation en milieu liquide pour la semence ovine en vue de l'insémination artificielle, Thèse, Université de Tours, 80p.
- Baril G., Chemineau P., Cognie Y., Guérin Y., Leboeuf B., Orgeur P., Vallet J.C., 1993. Manuel de formation pour l'insémination artificielle chez les ovins et les caprins. FAO (Ed), Rome, Italie, 47p.
- Chatterjee S., Gagnon C., 2001. Production of reactive oxygen species by spermatozoa undergoing cooling, freezing, and thawing. *Mol. Reprod. Dev.*, 59, 451-458.
- Colas G., 1975. Effect of initial freezing temperature, addition of glycerol and dilution on the survival and fertilizing ability of deep-frozen ram semen. *J. Reprod. Fertil.*, 42, 277-285.
- Colas G., 1984. Semen technology in the ram. In: *The male in farm animal reproduction*. Courot M. (Ed). Dordrecht, Martinus Nijhoff Publishers, 219-236.
- Colas G., Tryer M., Guerin Y., Aguer D., 1980. Fertilizing ability of ram sperm stored in a liquid state during 24 hours. 9th Int. Cong. Anim. Reprod. A.I., Madrid, Espagne, 315.
- Dacheux J.L., Druart X., Fouchecourt S., Syntin P., Gatti J.L., Okamura N., Dacheux F., 1998. Role of epididymal secretory proteins in sperm maturation with particular reference to the boar. *J. Reprod. Fertil., Suppl* 53, 99-107.
- Druart X., Cognie J., Baril G., Clément F., Dacheux J.L., Gatti J.L., 2008. Etude *in vivo* par endoscopie à fluorescence du transport et de la survie des spermatozoïdes de bélier dans le tractus génital femelle. *Renc. Rech. Rum.*, 367-370.
- Esbenshade K.L., Nebel R.L., 1990. Encapsulation of porcine spermatozoa in polylysine microspheres. *Theriogenology*, 33, 499-508.
- Fair S., Hanrahan J.P., O'Meara C.M., Duffy P., Rizos D., Wade M., Donovan A., Boland M.P., Lonergan P., Evans A.C.O., 2005. Differences between Belclare and Suffolk ewes in fertilization rate, embryo quality and accessory sperm number after cervical or laparoscopic artificial insemination. *Theriogenology*, 63, 1995-2005.
- Faustini M., Torre M.L., Stacchezzini S., Norberti R., Consiglio A.L., Porcelli F., Conte U., Munari E., Russo V., Vigo D., 2004. Boar spermatozoa encapsulated in barium alginate membranes: a microdensitometric evaluation of some enzymatic activities during storage at 18 °C. *Theriogenology*, 61, 173-184.
- Guérin Y., 1990. Méthodes de conservation de la semence ovine. *Elev. Ins.*, 236, 3-14.
- Hollinshead F.K., Gillan L., O'Brien J.K., Evans G., Maxwell W.M., 2003. *In vitro* and *in vivo* assessment of functional capacity of flow cytometrically sorted ram spermatozoa after freezing and thawing. *Reprod. Fertil. Dev.*, 15, 351-359.
- Hollinshead F.K., O'Brien J.K., Gillan L., Meyers M., Maxwell W.M.C., Evans G., 2004a. Liquid storage of flow cytometrically sorted ram spermatozoa. *Theriogenology*, 62, 587-605.
- Hollinshead F.K., Evans G., Evans K.M., Catt S.L., Maxwell W.M.C., O'Brien J.K., 2004b. Birth of lambs of a pre-determined sex after *in vitro* production of embryos using frozen-thawed sex-sorted and re-frozen-thawed ram spermatozoa. *Reproduction*, 127, 557-568.
- Huang S.Y., Tu C.F., Liu S.H., Kuo Y.H., 2005. Motility and *in vitro* fertility: a preliminary study. *Anim. Reprod. Sci.*, 87, 111-120.
- Kershaw C.M., Khalid M., McGowan M.R., Ingram K., Leethongdee S., Wax G., Scaramuzzi R.J., 2005. The anatomy of the sheep cervix and its influence on the transcervical passage of an inseminating pipette into the uterine lumen. *Theriogenology*, 64, 1225-1235.
- Mara L., Accardo C., Pilichi S., Dattena M., Chessa F., Chessa B., Branca A., Cappai P., 2005. Benefits of TEMPOL on ram semen motility and *in vitro* fertility: a preliminary study. *Theriogenology*, 63, 2243-2253.
- Maxwell W.M., Salamon S., 1993. Liquid storage of ram semen: a review. *Reprod. Fertil. Dev.*, 5, 613-638.
- Maxwell W.M.C., Stojanov T., 1996. Liquid storage of ram semen in the absence or presence of some antioxidants. *Reprod. Fertil. Dev.*, 8, 1013-1020.
- Maxwell W.M.C., Watson P.F., 1996. Recent progress in the preservation of ram semen. *Anim. Reprod. Sci.*, 42, 55-65.
- Maxwell W.M.C., Nebel R.L., Lewis G.S., 1996. Survival and fertility of micro-encapsulated ram spermatozoa stored at 5°C. *Reprod. Domest. Anim.*, 31, 655-673.
- Molinia F.C., Evans G., Maxwell W.M., 1994. *In vitro* evaluation of zwitterion buffers in diluents for freezing ram spermatozoa. *Reprod. Nutr. Dev.*, 34, 491-500.

Munkittrick T.W., Nebel R.L., Saacke R.G., 1992. Accessory sperm numbers for cattle inseminated with protamine sulfate microcapsules. *J. Dairy Sci.*, 75, 725-731.

Nebel R.L., Bame J.H., Saacke R.G., Lim F., 1985. Microencapsulation of bovine spermatozoa. *J. Anim. Sci.*, 60, 1631-1639.

Nebel R.L., Vishwanath R., McMillan W.H., Pitt C.J., 1996. Microencapsulation of bovine spermatozoa: effect of capsule membrane thickness on spermatozoal viability and fertility. *Anim. Reprod. Sci.*, 44, 79-89.

Paulenz H., Adnoy T., Fossen O.H., Soderquist L., Berg K.A., 2002. Effect of deposition site and sperm number on the fertility of sheep inseminated with liquid semen. *Vet. Rec.*, 150, 299-302.

Paulenz H., Söderquist L., Ådnøy T., Fossen O.H., Berg K.A., 2003. Effect of milk- and TRIS-based extenders on the fertility of sheep inseminated vaginally once or twice with liquid semen. *Theriogenology*, 60, 759-766.

Paulenz H., Söderquist L., Ådnøy T., Nordstoga A., Gulbrandsen B., Berg K.A., 2004. Fertility results after different thawing procedures for ram semen frozen in minitubes and mini straws. *Theriogenology*, 61, 1719-1727.

Paulenz H., Soderquist L., Adnoy T., Nordstoga A.B., Berg K.A., 2005. Effect of vaginal and cervical deposition of semen on the fertility of sheep inseminated with frozen-thawed semen. *Vet. Rec.*, 156, 372-375.

Paulenz H., Adnoy T., Soderquist L., 2007. Comparison of fertility results after vaginal insemination using different thawing procedures and packages for frozen ram semen. *Acta Vet. Scand.*, 49, 26.

Paulenz H., Fossen O.H., Soderquist L., 2009. Effect on field fertility of addition of gelatine, different dilution rates and storage times of cooled ram semen after vaginal insemination. *Reprod. Dom. Anim.*, 44, 1-5.

Purdy P.H., Ericsson S.A., Dodson R.E., Sternes K.L., Garner D.L., 2004. Effects of the flavonoids, silibinin and catechin, on the motility of extended cooled caprine sperm. *Small Rum. Res.*, 55, 239-243.

Raoul J., Lagriffoul G., Castres A., 2008. Compte rendu annuel sur l'insémination artificielle ovine. Campagne 2007. Institut de l'élevage, Paris, France, 1-31.

Salamon S., Maxwell W.M.C., 1995. Frozen storage of ram semen I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. *Anim.Reprod. Sci.*, 37, 185-249.

Sarlos P., Molnar A., Kokai M., Gabor G., Ratky J., 2002. Comparative evaluation of the effect of antioxidants in the conservation of ram semen. *Acta Vet. Hung.*, 50, 235-245.

Uludag H., De Vos P., Tresco P.A., 2000. Technology of mammalian cell encapsulation. *Adv. Drug Delivery Rev.*, 42, 29-64.

Upreti G.C., Oliver J.E., Duganzich D.M., Munday R., Smith J.F., 1995. Development of a

chemically defined ram semen diluent (RSD-1). *Anim. Reprod. Sci.*, 37, 143-157.

Upreti G.C., Jensen K., Oliver J.E., Duganzich D.M., Munday R., Smith J.F., 1997. Motility of ram spermatozoa during storage in a chemically-defined diluent containing antioxidants. *Anim. Reprod. Sci.*, 48, 269-278.

Upreti G.C., Jensen K., Munday R., Duganzich D.M., Vishwanath R., Smith J.F., 1998. Studies on aromatic amino acid oxidase activity in ram spermatozoa: role of pyruvate as an antioxidant. *Anim. Reprod. Sci.*, 51, 275-287.

Vigo D., Faustini M., Torre M.L., Pecile A., Villani S., Asti A., Norbert R., Maggi L., Conte U., Cremonesi F., Stacchezzini S., Maffeo G., 2002. Boar semen controlled-delivery system: morphological investigation and in vitro fertilization test. *Reprod. Fertil. Dev.*, 14, 307-314.

Weber W., Rimann M., Schafroth T., Witschi U., Fussenegger M., 2006. Design of high-throughput-compatible protocols for microencapsulation, cryopreservation and release of bovine spermatozoa. *J. Biotechnol.*, 123,155-163.

Weber W., Rinderknecht M., Baba M.D.E., Glutz F.N., Auel D., Fussenegger M., 2004. CellMAC: a novel technology for encapsulation of mammalian cells in cellulose sulfate/pDADMAC capsules assembled on a transient alginate/Ca²⁺ scaffold. *J. Biotechnol.*, 114, 315-326.

Résumé

L'insémination ovine représente en 2007 43% du cheptel en races laitières et 4,3% en races allaitantes soit, respectivement, 636 000 et 202 000 inséminations. Les méthodes actuelles de conditionnement de la semence ovine sous forme liquide sont bien adaptées pour la réalisation des IA le jour de la collecte dans un secteur géographique réduit. Cependant, l'insémination devant être réalisée dans les 10 heures qui suivent la collecte pour obtenir une fertilité maximale, un allongement de la durée de conservation permettrait d'assouplir l'organisation de ces CIA et d'élargir la diffusion de la semence de béliers de haute valeur génétique. Les recherches portent sur trois méthodes de conservation : sous forme liquide, congelée ou encapsulée. Plusieurs facteurs influant sur la qualité de la semence après conservation ont été identifiés, comme la concentration finale en spermatozoïdes de la semence diluée et la présence d'antioxydants dans le milieu de conservation. La perte de fertilité après conservation se traduit également par une réduction de l'aptitude des spermatozoïdes à traverser le cervix et transiter dans le tractus génital femelle. Une meilleure compréhension des mécanismes mis en jeu lors de la traversée du cervix par les spermatozoïdes devrait permettre d'apporter des solutions adaptées pour améliorer les milieux de conservation.

Abstract

Conservation of ovine semen

In 2007, 43% of ovine dairy flocks and 4.3 % of suckling flocks, respectively, 636 000 and 202 000 ewes, were inseminated. Methods of ram semen preservation in liquid state were adequate when insemination was performed the day of the semen collection in a reduced geographic region. However, given that insemination needs to be performed in the 10 hours following the semen collection in order to reach high fertility, increasing the duration of semen storage could simplify the daily work of AI Centers and provide better use of rams of high genetic value. Research is being conducted on three methods of preservation: liquid state, freezing and encapsulation. Several factors potentially impacting on fertility after semen preservation were identified such as final sperm concentration and antioxidants. Semen preservation also induced a reduced ability of spermatozoa to cross the cervix and transit into the female genital tract. A better understanding of the mechanisms involved in sperm transit could help to conceive media better suited to sperm preservation.

DRUART X., GUÉRIN Y., GATTI J.-L., DACHEUX J.-L., 2009. Conservation de la semence ovine. *Inra Prod. Anim.*, 22, 91-96.