

Production et conservation de la semence de bouc pour l'insémination artificielle

La reproduction des chèvres par insémination artificielle (IA) offre des avantages sanitaires, génétiques et économiques pour les élevages caprins spécialisés en production de lait, de viande ou de poils. Excepté en France, l'IA caprine est encore peu pratiquée, que ce soit en Europe ou dans le reste du monde. Développer son utilisation nécessite d'améliorer la quantité de semence produite et sa qualité. L'efficacité des techniques de conservation de la semence à court ou long terme est un élément prépondérant pour que l'IA puisse répondre à la diversité des situations rencontrées dans les élevages caprins.

Les méthodes de contrôle de l'œstrus et de l'ovulation permettant de constituer des lots de femelles homogènes vis-à-vis de leur mise à la reproduction ont favorisé le développement de l'insémination artificielle (IA) chez les petits ruminants et en particulier chez la chèvre. Cette méthode est aujourd'hui utilisée

pour intensifier une production dans le cadre de programmes destinés à améliorer le potentiel génétique des races produisant du lait, de la viande ou des poils. Comparée à la saillie naturelle, l'IA permet un accroissement du nombre de descendants et donc du nombre de mâles ainsi qu'une dissociation spatio-temporelle entre la collecte de la semence et son utilisation. Ces avantages permettent l'évaluation, la sélection des mâles et la comparaison de la valeur génétique de leurs descendants grâce aux liens génétiques provenant des mâles d'IA. Cet article résume les principaux aspects de la production et de la conservation du sperme chez le bouc.

Résumé

Chez les races caprines saisonnées, les méthodes d'amélioration de production et de conservation de semence doivent prendre en considération l'influence de l'environnement et en particulier de la photopériode. Par la fonction qu'elle exerce sur la régulation du développement gonadique, celle-ci contribue indirectement au contrôle du comportement sexuel et de la production de sperme, tant du point de vue quantitatif que qualitatif. L'utilisation de traitements photopériodiques constitue donc un outil efficace pour augmenter la production des doses de sperme destinées à l'insémination artificielle durant la carrière de reproducteur du bouc. Afin d'optimiser la production et la qualité de la semence, une sélection préalable des mâles est cependant nécessaire.

Un problème spécifique dans la conservation de la semence de bouc est l'effet délétère du plasma séminal sur la viabilité des spermatozoïdes après congélation / décongélation, principalement lorsqu'ils sont dilués dans des milieux à base de lait ou de jaune d'œuf. La protéine responsable de cet effet est une enzyme sécrétée par les glandes bulbo-urétrales appartenant à la famille des lipases pancréatiques et qui possède une double activité lipasique et phospholipasique.

La conservation de la semence à l'état liquide, peu coûteuse, est un complément à la cryconservation pour développer l'insémination artificielle à grande échelle. Mais la diminution de la fécondance après 12 heures de conservation est un frein à l'utilisation de cette technique. Les méthodes de congélation disponibles actuellement diffèrent sur plusieurs aspects. Les plus efficaces incluent le lavage de la semence pour éliminer le plasma séminal dès la collecte.

1 / Production de semence

1.1 / Performances de reproduction

a / Maturité sexuelle et comportement sexuel

L'initiation du comportement sexuel chez le jeune bouc, qui se manifeste notamment par le flairage et les tentatives de saut, apparaît à des âges variables allant de quelques semaines (races européennes) à un an pour d'autres races (race Damascus). De fait, la maturité sexuelle peut apparaître à des âges très différents entre individus, qui vont de 4-8 mois à 1-4 ans selon qu'ils appartiennent à des races plus ou moins précoces (Lall 1947, Elwisy et Elsayaf 1971).

Chez le mâle adulte, la motivation et l'efficacité sexuelle dépendent à la fois des sécrétions hormonales et des relations sociales entre les animaux. Le début de la saison sexuelle est précédé par une augmentation des hormones androgènes d'origine testiculaire (Hoffman *et al* 1972), révélée par une spectaculaire augmentation de la concentration plasmatique de testostérone (Saumande et Rouger 1972). La motivation et l'efficacité sexuelle d'un bouc à l'intérieur d'un groupe d'animaux peuvent être modulées par une compétition basée sur des relations hiérarchiques de dominance. L'environnement social (présence de partenaires de même sexe ou de sexe opposé) joue aussi un rôle important pour faciliter la pleine expression du comportement sexuel chez le mâle (Rouger 1974), en interaction avec des facteurs tels que la nutrition ou la saison (Walkden-Brown *et al* 1994a).

b / Production de sperme

Peu d'études ont été réalisées chez le bouc pour évaluer la production spermatique. Les informations disponibles sur la production quotidienne par mâle, ou DSP pour *daily sperm production*, indiquent que celle-ci varie de 5,5 à 14,5 x 10⁹ spermatozoïdes, avec de faibles variations saisonnières entre races (Derashri *et al* 1992, Walkden-Brown *et al* 1994a). Chez le bouc Cachemire australien, le poids testiculaire et la production de spermatozoïdes testiculaires sont étroitement corrélés avec la circonférence scrotale ($r=0,88$ et $r=0,72$ respectivement). La mesure de cette circonférence constitue la méthode indirecte la plus simple et la plus efficace pour estimer le volume testiculaire et la production de spermatozoïdes. Ritar *et al* (1992) ont estimé que la DSP des mâles Angora en saison sexuelle atteint 4,0 à 6,4 x 10⁹ spermatozoïdes. Dans cette race, les réserves épидидymaires en spermatozoïdes sont elles-mêmes corrélées avec le poids testiculaire ($r=0,50$, $P=0,01$), et avec le nombre de spermatozoïdes du testicule ($r=0,42$, $P=0,07$), mais non avec le poids de l'épididyme.

Sur la base d'un rythme intensif de deux collectes par jour pendant neuf jours, la quantité de spermatozoïdes collectée par jour, ou DSO pour *daily sperm output*, représente de 40 à 80 % de la DSP. Chez les boucs des races Alpine et Saanen, la DSO est de $2,96 \pm 0,36 \times 10^9$ spermatozoïdes (Delgadillo *et al* 1993).

c / Variations saisonnières de l'activité sexuelle et de la production de sperme

La durée de la saison sexuelle varie inversement avec la latitude, les races de chèvre ayant la saisonnalité la plus marquée étant celles vivant à des latitudes moyennes ou élevées (supérieure à 35°). Pour ces races, les mises bas ne sont pas réparties régulièrement au cours de l'année : les naissances ont lieu en hiver ou au début du printemps. La période des saillies naturelles de ces races saisonnières commence à la fin de l'été et se poursuit à l'automne. Les races tropicales ou subtropicales peuvent se reproduire toute l'année, mais la période de mise bas dépend de

facteurs de l'environnement autres que la photopériode (Chemineau et Xandé 1982, Restall 1991).

Chez les boucs des races saisonnières, le comportement sexuel, le volume testiculaire et la production de spermatozoïdes sont influencés par les changements photopériodiques (Ortavant 1977, Laubser *et al* 1982, Branca et Cappai 1989). Ainsi, l'on observe une diminution de l'activité sexuelle durant le printemps en opposition avec une augmentation de l'activité alimentaire (Rouger 1974). Cependant cette diminution est atténuée si les animaux sont entraînés régulièrement à éjaculer dans un vagin artificiel (Corteel 1981). Chez le bouc australien de race Cachemire, la reprise saisonnière de l'activité sexuelle en fin d'été et à l'automne s'accompagne d'une augmentation du poids vif, de la circonférence scrotale, de l'intensité de l'odeur sexuelle, de la concentration plasmatique de testostérone, ainsi que d'une diminution de la quantité de nourriture ingérée (Walkden-Brown *et al* 1994b).

Le volume des éjaculats des boucs des races Alpine et Poitevine est élevé en automne et en hiver, c'est-à-dire pendant la saison sexuelle. Il diminue ensuite pour atteindre un minimum au printemps et en été, en période de repos sexuel. La concentration de spermatozoïdes dans l'éjaculat suit une tendance inverse (Corteel 1977 ; figure 1) avec des variations saisonnières de la sécrétion du plasma séminal à partir des glandes annexes, lesquelles sont plus actives quand la concentration plasmatique de testostérone est élevée durant la saison sexuelle.

La qualité des spermatozoïdes éjaculés est elle-même affectée par la saison. Ainsi, le taux de spermatozoïdes mobiles est élevé pendant la saison sexuelle et bas en dehors de cette période (Delgadillo 1990). En dehors de la saison sexuelle, la motilité du sperme dilué diminue pour atteindre un niveau minimum pendant plusieurs semaines (Corteel 1981; figure 2). Quand les chèvres de race Alpine sont inséminées hors saison sexuelle, les variations de la fertilité suivent les variations de la motilité (Corteel 1976). De faibles variations saisonnières du taux de spermatozoïdes présentant des anomalies morphologiques ont ainsi été observées (de 5 à 8 % durant la saison sexuelle et de 10 à 18 % en dehors de celle-ci : Corteel 1977, Delgadillo 1990, Tuli et Holtz 1992).

1.2 / Maîtrise de la production de sperme

a / Traitements photopériodiques

L'utilisation de traitements photopériodiques, initialement développés chez le bélier (Pelletier *et al* 1988), a permis de contrôler l'activité de reproduction des boucs dans les races saisonnières (Delgadillo *et al* 1992). L'alternance répétée d'une période de jours longs (16 h de lumière : 8 h de nuit = 16L:8N) pendant 1 à 2 mois et d'une période de jours courts (8L:16N) pendant 1 à 2 mois diminue

Dans les zones tempérées, l'activité sexuelle des boucs et la production de spermatozoïdes varient avec la saison.

Figure 1. Variations mensuelles du volume de l'éjaculat et de sa teneur en spermatozoïdes chez le bouc de race Alpine ($n = 5$ boucs âgés de 10 mois au début de l'étude) en France à 45° de latitude nord (adapté de Corteel 1977).



les variations saisonnières de l'activité sexuelle des boucs des races Alpine et Saanen (figure 3). Les avantages de ces traitements sont considérables : le nombre de doses d'IA produites durant les deux premières années du traitement a été supérieur de 62 % par rapport aux témoins (Delgadillo *et al* 1992). Dans les races saisonnées, de telles manipulations photopériodiques permettent de collecter la semence toute l'année au lieu de les restreindre aux six mois de la saison sexuelle. Ainsi le stock de doses pour l'IA peut être largement augmenté au cours des premières années de vie des boucs.

b / Influence de la température

L'activité sexuelle des boucs sous les moyennes et hautes latitudes n'apparaît pas être dépendante des variations thermiques de l'environnement, alors que sous les climats tropicaux ou subtropicaux la température peut être un facteur limitant les capacités de reproduction. Ainsi, le volume et la concentration de spermatozoïdes dans les éjaculats sont diminués en périodes de hautes températures (Hiroe et Tomozuka 1966, Masaki et Masuda 1968, Yokoki et Ogasa 1977, Murugaiyah 1992).

c / Environnement social et conduite des animaux

Les différentes interactions entre les mâles et les femelles jouent un rôle important dans le démarrage et le maintien du comportement sexuel dans les deux sexes. La présence permanente d'autres animaux du même sexe ou du sexe opposé peut modifier les capacités de

reproduction des mâles à moyen ou long terme (Signoret *et al* 1990).

Les jeunes boucs utilisés pour la production de semence en système intensif de production sont élevés en cases individuelles à partir du sevrage jusqu'à la fin de leur carrière de producteur de semence (de Montigny et Lequenne 1975). L'élevage des boucs en groupe unisexe durant la période prépubertaire est défavorable au comportement sexuel futur des animaux, lorsqu'ils seront sollicités à la collecte au vagin artificiel. De plus, Orgeur *et al* (1990) ont montré que l'élevage des boucs en groupe hétérosexuel a un effet favorable sur la production de semence.

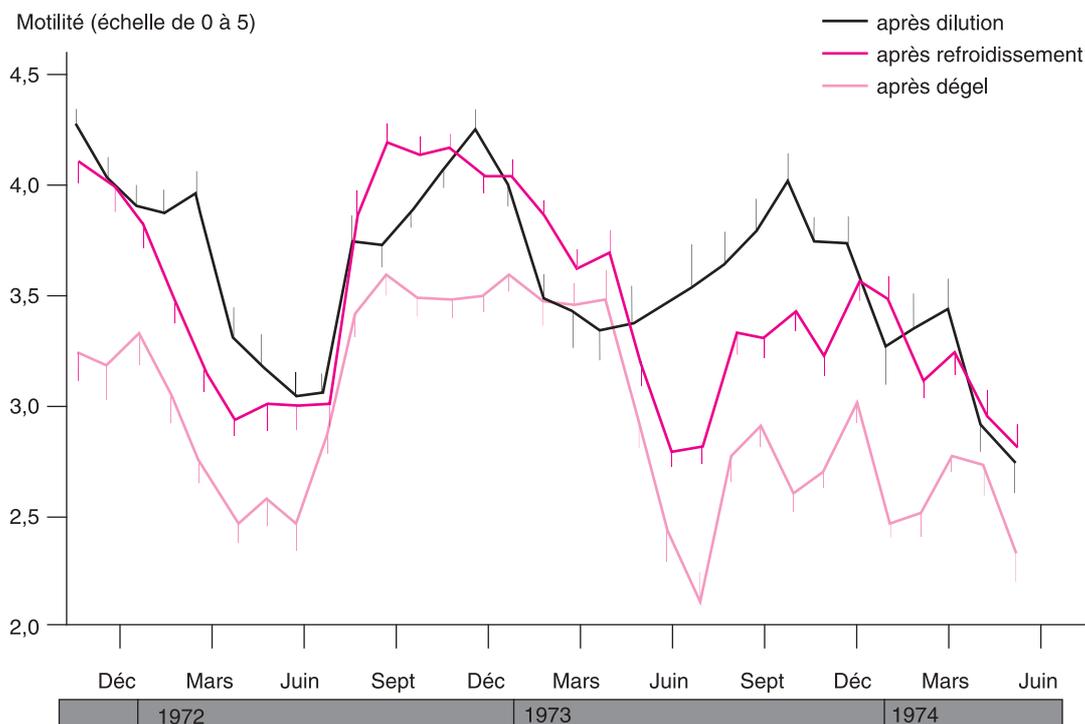
d / Méthodes et fréquence de collecte de semence

La semence est généralement collectée au vagin artificiel en présence d'une chèvre boute-en-train maintenue en oestrus par des injections de benzoate d'œstradiol. La collecte par électro-éjaculation est peu utilisée car les volumes de sperme obtenus sont plus importants et les concentrations de spermatozoïdes plus faibles qu'avec la technique de collecte au vagin artificiel, mais sans diminution de la motilité des spermatozoïdes (Akusu *et al* 1984). Comme le plasma séminal a un effet défavorable sur la conservation *in vitro* des spermatozoïdes (Nunes 1982), l'électro-éjaculation n'est pas préconisée chez le bouc.

Durant la saison sexuelle, sous les hautes latitudes, une augmentation de deux à sept collectes hebdomadaires (au vagin artificiel) triple le nombre de spermatozoïdes obtenus

L'application de traitements photopériodiques et l'augmentation de la fréquence des collectes permettent d'augmenter la production de semence.

Figure 2. Variations mensuelles de la motilité des spermatozoïdes après dilution, refroidissement et dégel chez le bouc de race Alpine ($n = 5$ boucs âgés de 10 mois au début de l'étude) en France à 45° de latitude nord (adapté de Corteel 1977).



par semaine (Corteel *et al* 1978). Cependant la durée du repos sexuel entre les collectes a un effet favorable sur l'aptitude du sperme à la congélation. En pratique il est recommandé de respecter des intervalles entre collectes de deux jours au cours de la première partie de la saison sexuelle, et de trois jours durant la seconde moitié de celle-ci (Boué et Corteel 1992).

e / Sélection des mâles sur l'aptitude à la production de semence

Une méthode de tri des jeunes mâles des races Alpine et Saanen sur leur aptitude à la production de semence destinée à l'IA a été proposée par Corteel *et al* (1987). Les mâles sont sélectionnés à partir des résultats des 15 premières sollicitations à la collecte, sur leur comportement sexuel, le nombre de spermatozoïdes obtenus par éjaculat et le taux de survie des spermatozoïdes après congélation / décongélation. Avec cette méthode, les performances de production de semence de boucs adultes de races Alpine et Saanen, préalablement sélectionnés dans leur jeune âge, sont supérieures aux performances de mâles non sélectionnés (Corteel *et al* 1987).

2 / Conservation de la semence

2.1 / Considérations générales

La conservation de la semence, particulièrement à l'état congelé, provoque des dommages aux spermatozoïdes qui concernent à la fois leurs structures (membranes, flagelles) et leur état fonctionnel. Ces altérations influencent leur motilité et leur viabilité.

Malgré de nombreux travaux consacrés à ces problèmes, la fertilité de la semence congelée demeure généralement plus faible que celle de la semence conservée pendant quelques heures à température positive.

L'effet délétère du plasma séminal sur la viabilité des spermatozoïdes conservés dans un milieu à base de lait écrémé ou contenant du jaune d'œuf, constitue un problème spécifique pour la conservation de la semence de bouc. Une enzyme sécrétée dans le plasma séminal par les glandes bulbo-uréthrales, nommée egg yolk coagulating enzyme (EYCE), a d'abord été mise en évidence par Roy (1957) et Iritani *et al* (1961). Plus récemment, Nunes (1982) a montré qu'une protéine (SBU III) sécrétée aussi par les glandes bulbo-uréthrales avait un effet négatif sur la survie *in vitro* des spermatozoïdes en présence de constituants lactés du dilueur.

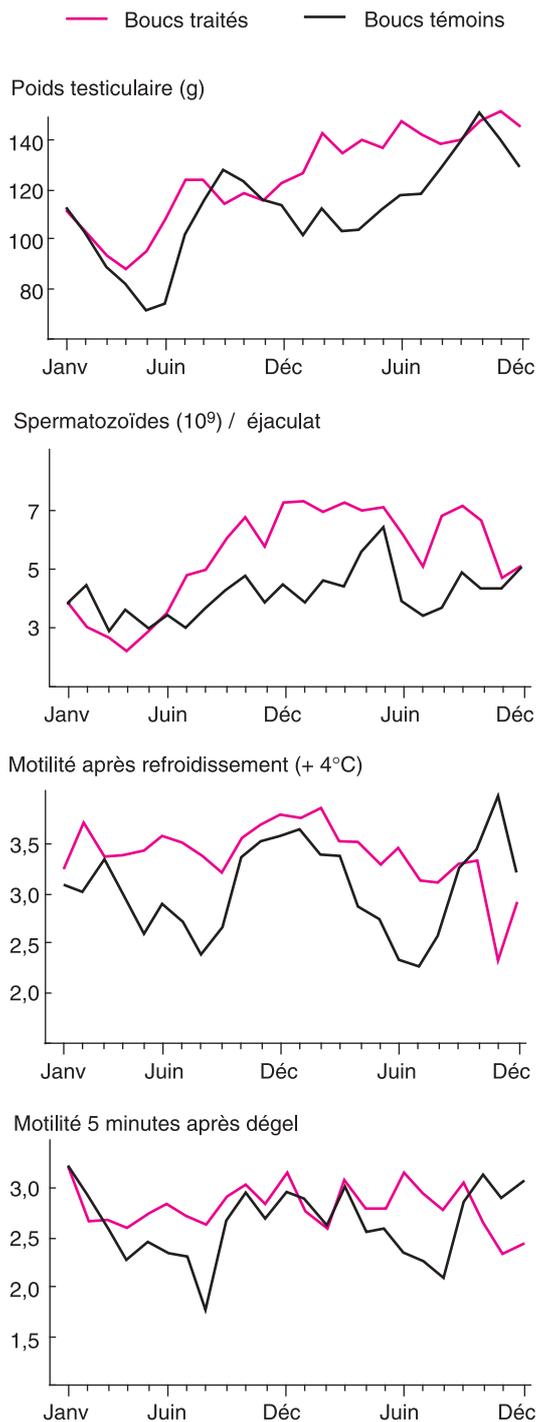
a / L'enzyme de coagulation du jaune d'œuf (EYCE)

La toxicité de l'enzyme EYCE sur les spermatozoïdes varie avec le pH, la température, la quantité de plasma séminal, la saison de production et la race des poules ayant produit le jaune d'œuf utilisé. Quand les spermatozoïdes de boucs sont débarrassés du plasma séminal par lavage avant dilution dans un milieu à base de jaune d'œuf et conservation à 4 °C, leur taux de survie est supérieur à celui des spermatozoïdes non lavés (Roy 1957, Iritani *et al* 1961).

L'enzyme EYCE a été identifiée comme une phospholipase A, laquelle hydrolyse la lécithine du jaune d'œuf en acides gras et lysolécithine (Iritani et Nishikawa 1961 et 1963), ce dernier composant étant toxique pour les spermatozoïdes de bouc.

La présence de plasma séminal altère la viabilité des spermatozoïdes conservés dans un milieu à base de lait ou de jaune d'œuf.

Figure 3. Effet d'un traitement photopériodique (voir texte) sur le poids testiculaire, le nombre de spermatozoïdes et leur motilité après refroidissement et après décongélation chez des boucs ($n = 18$ boucs âgés de 12 mois au début de l'étude) de races Alpine et Saanen à 45° de latitude nord (adapté de Delgadillo et al 1992).



b / La protéine SBU III

Cette protéine est sécrétée par les glandes bulbo-urétrales. Nunes (1982) a montré que SBU III est responsable de la diminution de la survie *in vitro* des spermatozoïdes conservés dans un milieu à base de lait écrémé. L'addition de SBU III à ce milieu réduit la viabilité des spermatozoïdes lavés, alors qu'aucun effet n'est observé lorsqu'ils sont

dilués dans une solution saline Krebs-Ringer-Phosphate-Glucose (KRPBG). Des observations en microscopie électronique ont révélé que 95 % des spermatozoïdes provenant de la queue de l'épididyme et dilués dans un milieu lacté déclenchent une réaction acrosomique après exposition aux sécrétions bulbo-urétrales (SBU). Les sécrétions des glandes vésiculaires (SGV) induisent une réaction acrosomique chez seulement 5 % des spermatozoïdes. Mais un mélange des deux sécrétions (SGV = 2,5 μ l/ml + SBU 2,5 μ l/ml) induit seulement 26,7 % de réaction acrosomique, ce qui montre l'effet protecteur des sécrétions vésiculaires (Courtens *et al* 1984).

La protéine SBU III, responsable de la détérioration des spermatozoïdes dilués dans un milieu à base de lait écrémé, est un monomère de 55-60 kDa N-glycosyl, protéine appelée BUSgp60 par Pellicer (1995). Elle induit la diminution du taux de spermatozoïdes mobiles et de la motilité, une altération de l'acrosome et la mort des spermatozoïdes épididymaires en présence de dilueur à base de lait écrémé. Pellicer et Combarnous (1998) ont montré que BUSgp60 génère des produits de lipolyse cytotoxiques (acides gras), en hydrolysant les triglycérides résiduels du dilueur à base de lait écrémé utilisé pour la cryoconservation des spermatozoïdes.

BUSgp60 présente une grande homologie avec les lipases pancréatiques apparentées de type 2 (PLRP2 ; Sias 2000). Contrairement aux lipases classiques qui hydrolysent sélectivement les triglycérides, les PLRP2 possèdent également des activités phospholipasique A1 (Thirstrup *et al* 1994) et galactolipasique (Andersson *et al* 1996).

Les PLRP2 ont été mises en évidence chez différentes espèces, dans différents tissus (pancréas, intestin grêle, lymphocytes) et leur rôle physiologique est encore peu connu (Thirstrup *et al* 1994). Chez la souris, une fonction antimicrobienne a déjà été suggérée pour les PLRP2 présentes dans les cellules T cytotoxiques et dans les cellules de Paneth qui sécrètent également le lysozyme (Lowe *et al* 1998).

Ainsi EYCE, identifiée comme une phospholipase A, et la lipase BUSgp60 seraient une seule et même enzyme agissant à la fois sur les phospholipides du jaune d'oeuf et sur les lipides résiduels du dilueur à base de lait écrémé. Toutes les lipases PLRP2 caractérisées jusqu'à présent possèdent aussi une activité phospholipasique et des expériences préliminaires (Sias 2000) ont montré que BUSgp60 présentait une activité sur jaune d'oeuf.

c / Plasma séminal et lavage du sperme

L'élimination du plasma séminal par lavage des spermatozoïdes de bouc dans un milieu physiologique, immédiatement après la collecte, augmente le pourcentage de spermatozoïdes mobiles et leur motilité durant leur conservation à 37 °C ou après congélation / décongélation et incubation à 37 °C, dans des milieux à base de lait écrémé (Corteel 1974)

ou dans des milieux contenant du jaune d'œuf (Fougner 1974, Ritar et Salamon 1982). Mais l'élimination du plasma séminal n'est pas nécessaire à la survie des spermatozoïdes conservés à 4 °C (Leboeuf *et al* 2003).

Les éjaculats collectés en saison sexuelle contiennent plus de plasma séminal que ceux obtenus en dehors de celle-ci. Une corrélation négative entre le volume de plasma séminal de l'éjaculat et le pourcentage de cellules mobiles après décongélation a été mise en évidence par Corteel (1977). Le taux de survie après congélation-décongélation est proportionnel ($r = 0,9$) à la concentration de spermatozoïdes dans l'éjaculat.

Quand on compare la survie *in vitro* du sperme épидидymaire ou éjaculé, après dilution dans un milieu lacté, le pourcentage de spermatozoïdes mobiles et la motilité après congélation / décongélation et incubation à 37 °C sont plus élevés pour le sperme épидидymaire que pour le sperme éjaculé (Chemineau 1978). Le plasma séminal produit en dehors de la saison sexuelle est plus défavorable au taux de survie et à la motilité des spermatozoïdes épидидymaires dilués dans un milieu à base de lait écrémé que le plasma séminal produit au cours de la saison sexuelle. Cela suggère que l'effet négatif des sécrétions des glandes bulbo-urétrales est partiellement inhibé par les sécrétions des glandes vésiculaires seulement durant la saison sexuelle (Nunes 1982).

2.2 / Conservation de la semence à l'état liquide

La semence de bouc est conservée à des températures allant de 2 à 15 °C, le plus souvent à 4 °C. Une conservation à 4 °C est préférable à 15 °C dans les milieux à base de lait ou de phosphocasinat natif (PPCN) (Leboeuf *et al* 2003). De nombreux dilueurs ont été utilisés en routine. Les milieux à base de lait écrémé sont les plus utilisés actuellement pour la conservation de la semence à l'état liquide à 4 °C. Bien qu'avec le milieu PPCN, le taux de survie des spermatozoïdes après 7 jours de conservation à 4 °C soit supérieur à celui obtenu dans le milieu lacté (Leboeuf *et al* 2003), la fertilité après IA (taux de mise bas) n'est pas différente pour les deux dilueurs. Elle atteint 75 % pour des durées de conservation inférieure à 12 heures et diminue progressivement à 63 % après 28 heures, puis 34 % après 76 heures de conservation (Leboeuf 2001).

Peu d'études ont été conduites sur les causes de diminution de la fertilité après IA intra-cervicale en relation avec la durée de conservation de la semence à l'état liquide. Ces causes sont probablement les mêmes que celles observées dans l'espèce ovine : problèmes intervenant lors du transport de la semence et faible taux de survie des spermatozoïdes dans le tractus génital femelle (Maxwell et Salamon 1993). Eppleston *et al* (1994) ont montré que les spermatozoïdes de boucs déposés par IA intra-utérine demeureraient encore féconds après 8 jours de

conservation à 5 °C dans un milieu à base de tris-fructose-acide citrique-jaune d'œuf. Pomarès *et al* (1994) rapportent une amélioration de la survie durant 12 jours de conservation à 4 °C, lorsqu'on incorpore de la glutathion peroxidase (1 unité / ml) dans le milieu de conservation à base de tris. L'incorporation d'autres antioxydants dans le milieu à base de tris, tels que la catalase, la superoxydismutase, le cytochrome c, en plus de la glutathion peroxydase, améliore la survie des spermatozoïdes pendant 6 jours de conservation à 5 °C, mais qui ne s'accompagne pas d'un meilleur taux de fécondation *in vitro* (Pomarès *et al* 1994, Stojanov *et al* 1994). Enfin l'incorporation de vitamine E (8µg/ml) dans le milieu à base de lait écrémé réduit la peroxydation des lipides membranaires (Labbé *et al* 2003).

2.3 / Conservation de la semence à l'état congelé

Depuis que la semence de bouc a été congelée (-78 °C) pour la première fois par Smith et Polge (1950) puis par Barker (1957), mais avec des résultats de fertilité trop faibles pour être d'un intérêt économique, de nombreuses études ont été engagées sur le sujet. Les premières méthodes de congélation ainsi que la plupart des dilueurs utilisés étaient alors ceux qui donnaient les meilleurs résultats dans l'espèce bovine. Cependant, une grande variation de la fertilité était observée (Corteel 1973), due en partie à la congélation en présence du plasma séminal, pourtant déjà connu comme ayant des effets délétères. Les variations des taux de fertilité pouvaient aussi être attribuées aux différents temps d'équilibration (de 1 à 24 heures) après adjonction des cryoprotecteurs dans les milieux de congélation, la durée optimale d'équilibration étant de 1 à 3 heures (Corteel 1974, Das et Rajkonwar 1995, Singh *et al* 1995).

Le lavage de la semence de bouc consiste en une dilution, dès la collecte des éjaculats, avec une solution saline sur la base du volume (1:5-1:10) ou du nombre de spermatozoïdes (400×10^6 spermatozoïdes totaux par ml de solution de lavage), puis une centrifugation à 600-1000 g pendant 10 à 15 minutes. Selon les auteurs, différentes solutions de lavage sont utilisées, telles que le tampon Krebs-Ringer-Phosphate (avec ou sans glucose), ou des milieux de congélation (lait écrémé, tris ou d'autres milieux) sans glycérol.

a / Dilueurs et cryoprotecteurs

De nombreux dilueurs ont été testés pour la congélation de la semence de bouc. Les dilueurs les plus largement utilisés sont soit à base de lait écrémé déshydraté reconstitué et de glucose (0,5M) (Corteel 1974 et 1975), soit à base de tris-glucose-acide citrique-jaune d'œuf (Salamon et Ritar 1982).

L'éthylène glycol et le propylène glycol sont de moins bons cryoprotecteurs pour les spermatozoïdes que le glycérol (Waide *et al* 1977), qui est le plus utilisé pour la congélation de la

La conservation de la semence à l'état liquide se fait le plus souvent à 4°C. La fécondance diminue au-delà de 12 heures de conservation.

semence de bouc. En pratique, la concentration de glycérol préconisée par les différents auteurs varie de 3 % à 9 % avec un optimum de 4 à 7 %. Avec la méthode de Corteel (1974, 1975 et 1990), après une double centrifugation pour éliminer le plasma séminal, la semence est pré-diluée à 1×10^9 spz / ml avec le dilueur lacté sans glycérol puis refroidie de 20 °C à 4 °C en 1 heure. Le dilueur lacté contenant le glycérol (14 %) est ajouté à la semence à 4 °C, en 3 étapes à 10 minutes d'intervalle, afin d'obtenir une concentration finale de 7 % de glycérol et de 500×10^6 spermatozoïdes /ml. Dans la méthode de Ritar et Salamon (1982) le dilueur au jaune d'œuf (2 %) glycérolé (4 %) est ajouté en une seule fois à la semence non lavée, à 30 °C. L'addition du glycérol à 5 °C n'aurait pas d'avantage par rapport à l'addition à 30 °C (Salamon et Ritar 1982, Tuli et Holtz 1994).

b / Méthodes de congélation

La congélation est réalisée en paillettes de 0,25 ml ou en pellets. Les paillettes contenant la semence sont disposées horizontalement au-dessus de l'azote liquide en 2 étapes, à 16 cm pendant 2 minutes puis à 4 cm pendant 3 minutes, avant immersion dans l'azote liquide à -196 °C. Les pellets sont congelés à -70 °C sur de la neige carbonique puis immergés dans l'azote liquide. La congélation en paillettes est la plus utilisée ; elle permet une identification et une manipulation plus faciles des doses de semence qu'avec les pellets.

c / Décongélation de la semence

Plusieurs vitesses de décongélation ont été préconisées selon les espèces. La semence de bouc conservée en paillettes ou en pellets et décongelée à 37 °C (Corteel 1974, Salamon et Ritar 1982) a donné des résultats de fertilité satisfaisants et cette température est facilement applicable à la pratique de l'insémination artificielle dans les élevages. Deka et Rao (1987) ont observé que la décongélation à 37 °C comparés à 5 °C améliorerait la motilité et le taux d'acrosomes normaux. D'autres études ont montré que la décongélation de la semence de bouc à des températures élevées (70 à 75 °C) pendant une très courte durée (7 à 10 secondes) permettait d'obtenir un taux de survie des spermatozoïdes supérieur à celui observé après décongélation à 35-40 °C durant 20 à 30 secondes (Andersen 1969, Tuli *et al* 1991). La décongélation à température très élevée pendant un temps court n'est cependant pas utilisée en pratique car il est difficile dans ces conditions de respecter de façon rigoureuse les conditions de décongélation.

2.4 / Comparaison entre les méthodes de conservation

La comparaison des méthodes de congélation / décongélation de la semence est difficile en raison des nombreux paramètres impliqués et du manque d'uniformité des méthodologies

utilisées. Les procédures peuvent différer sur les points suivants :

- l'utilisation ou non de mâles sélectionnés sur la congélabilité de leur semence ;
- l'élimination ou non du plasma séminal ;
- les méthodes de lavage, la composition des solutions de lavage, l'intensité du lavage ;
- la composition des dilueurs de congélation ;
- la concentration de glycérol et son mode d'adjonction ;
- la durée du temps d'équilibration avant congélation ;
- le conditionnement de la semence en paillettes (0,25 ml ou 0,50 ml) ou en pellets ;
- les conditions de refroidissement de la semence.

Conclusion et perspectives

Les principales méthodes et techniques ayant contribué à l'amélioration de la production et de la conservation de la semence de bouc ont permis de dégager les acquis suivants :

- la conduite attentive de l'élevage des reproducteurs et leur sélection est la première étape permettant d'obtenir une semence apte à être utilisée en IA ;
- le choix de la méthode de conservation de la semence est aussi un point clé à prendre en compte, en relation avec le plasma séminal qui altère la viabilité *in vitro* de la semence, spécialement lorsqu'elle est soumise à la congélation ;
- l'utilisation de traitements photopériodiques permettant de collecter des éjaculats de qualité toute l'année ;
- l'identification des sécrétions des glandes bulbo-urétrales et de leurs interactions avec les composants des dilueurs impliqués dans l'altération des spermatozoïdes. Des études sont actuellement en cours sur l'inhibition de la lipase sécrétée par les glandes bulbo-urétrales dans le but de supprimer l'étape de l'élimination du plasma séminal des éjaculats destinés à être cryoconservés.

Une nouvelle voie émergente d'investigation concerne la modification des constituants membranaires des spermatozoïdes afin de les rendre plus résistants aux dommages potentiels de la cryoconservation. Ce type d'investigation a déjà montré tout son intérêt dans des espèces non mammaliennes telles que les oiseaux et les poissons. Dans ces espèces, en effet, il apparaît que la composition des lipides membranaires, qui conditionne en grande partie l'aptitude à la congélation / décongélation, peut être modifiée par voie alimentaire. La modification *in vitro* des structures cellulaires fait l'objet d'autres approches. Dans les deux cas, ces modifications membranaires sont destinées à augmenter la résistance des spermatozoïdes, ce qui pourrait conduire à une plus grande proportion d'éjaculats congelés utilisables en IA et également augmenter la fertilité moyenne des troupeaux inséminés avec du sperme congelé.

Plusieurs méthodes de congélation existent. Pour améliorer la qualité de la semence après décongélation, les recherches s'orientent actuellement vers la modification des membranes des spz afin d'accroître leur résistance.

Références

- Akusu M.O., Agiang E.A., Egbunike G.N., 1984. Ejaculate and plasma characteristics of West African Dwarf (WAD) buck. 10th Intl Congr. Anim. Reprod. A.I. June 10-14, 1984, Illinois, Vol 2, Abstract n°50.
- Andersen K., 1969. Insemination with frozen semen in goats. European Ass. Anim. Prod. Meeting, Helsinki, June 1969, 2, 23-26.
- Andersson L., Carrière F., Lowe M.E., Nilsson A., Verger R., 1996. Pancreatic lipase-related protein 2 but not classical pancreatic lipase hydrolyses galactolipids. *Biochim. Biophys. Acta*, 1302, 236-240.
- Barker C.A., 1957. Some aspects of artificial insemination in swine and goats. Proc. 10th Ann. Conv. National Assoc. Artif. Breeders, Toronto, 127-132.
- Boué P., Corteel J.M., 1992. Aptitude of male goat sperm to withstand freezing: combined effects of season and time of sexual rest between two successive semen collections. In : Lokeshar R.R. (ed), Recent Advances in Goat Productions. Proc. 5th Intl Conf. on Goats, New-Delhi, Vol 2, 1042-1045.
- Branca A., Cappai P., 1989. Osservazioni sul controllo della riproduzione nelle specie caprina: esperienze effettuate in Sardegna. Symp. Intl La Riproduzione nei piccoli ruminati: basi fisiologiche e aspetti applicativi, Varese, 115-129.
- Chemineau P., 1978. Recherche de l'origine de l'effet dépressif du plasma séminal sur l'aptitude des spermatozoïdes de bouc à supporter la congélation. Université P. et M. Curie, Paris, 20 p.
- Chemineau P., Xandé A., 1982. Reproductive efficiency of Creole meat goats permanently kept with males. Relationship to a tropical environment. *Trop. Anim. Prod.*, 7, 98-104.
- Corteel J.M., 1973. L'insémination artificielle caprine : bases physiologiques, état actuel et perspectives d'avenir. *World Rev. Anim. Prod.*, 9, 73-99.
- Corteel J.M., 1974. Viabilité des spermatozoïdes de bouc conservés et congelés avec ou sans leur plasma séminal : effet du glucose. *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.*, 14, 741-745.
- Corteel J.M., 1975. Effet du 'lavage' sur la conservation des spermatozoïdes de bouc à basse température. *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.*, 15, 525-528.
- Corteel J.M., 1976. Variations de la motilité et de la fécondité des spermatozoïdes de bouc. *Ann. Zootech.*, 25, 567-571.
- Corteel J.M., 1977. Production, storage and artificial insemination of goat semen. In : Management of Reproduction in Sheep and Goats Symposium, Madison, July 24-25, 41-57.
- Corteel J.M., 1981. Collection, proceeding and artificial insemination of goat semen. In: Gall C. (ed), Goat production, 171-191. Academic Press (London).
- Corteel J.M., 1990. Maîtrise de la reproduction chez les caprins à vocation laitière. 5as Jornadas Internacionales de Reproduccion Animal e Inseminacion Artificial, 14-17 June 1990, Zaragoza, Espagne, 188-274.
- Corteel J.M., Baril G., Leboeuf B., Marcellier N., 1978. Voies disponibles pour augmenter l'utilisation des meilleurs boucs. 4ème Journées Rech. Ovine et Caprine, 358-366. Edition Inra-Itovic, Paris.
- Corteel J.M., Baril G., Leboeuf B., 1987. Développement et application of artificial insemination with deep frozen semen and out-of season breeding of goats in France. Proc. 4th Intl. Conf. Goats. Brasilia, March 9-13, Vol 1, 523-547.
- Courtens J.L., Nunes J., Corteel J.M., 1984. Induction of the acrosome reaction in the spermatozoa of the goat by secretions of the male accessory glands and milk. *Gamete Res.*, 9, 287-302.
- Das K.K., Rajkonwar C.K., 1995. Effects on the motility of buck semen during freezing with lactose egg yolk glycerol extender. *Int. J. Anim. Sci.*, 10, 127-128.
- Deka B.C., Rao A.R., 1987. Effect of extenders and thawing methods on post-thawing preservation of goat semen. *Indian Vet. J.*, 64, 591-594.
- Delgadillo J.A., 1990. Abolition des variations saisonnières de l'activité sexuelle chez le bouc par des traitements photopériodiques. Thèse, Montpellier, France, 119 p.
- Delgadillo J.A., Leboeuf B., Chemineau P., 1992. Abolition of seasonal variations in semen quality and maintenance of sperm fertilizing ability by short photoperiodic cycles in he-goats. *Small Ruminant Research*, 9, 47-59.
- Delgadillo J.A., Leboeuf B., Chemineau P., 1993. Maintenance of sperm production in bucks during a third year of short photoperiodic cycles. *Reprod. Nutr. Dev.*, 33, 609-617.
- De Montigny G., Lequenne D., 1975. Observations sur la croissance et le comportement sexuel de jeunes boucs élevés en lots. 1ères Journées Rech. Ovine et Caprine, 18-22. Edition Inra-Itovic, Paris.
- Derashri H.J., Pathak A.K., Bansal K.K., Sharma A.K., Verma S.K., 1992. Reproduction in buck. 2. Daily sperm output, extra-gonadal sperm reserve, daily sperm production rate and seminiferous tubule length. Pre-Conference Proceeding, Abstract of Contributory papers, Vol. 1, 264, 5th Intl. Conf. on Goats, New-Delhi, March 2-8.
- Elwishy A.B., Elsawaf S.A., 1971. Development of sexual activity in male Damascus goats. *Indian J. Anim. Sci.*, 5, 350-355.
- Eppleston J., Pomares C.C., Stojanov T., Maxwell W.M.C., 1994. In vitro and in vivo fertility of liquid stored goat spermatozoa. *Proc. Aust. Soc. Reprod. Biol.*, 26, 111 (abstract).
- Fougner J.A., 1974. Intrauterin inseminasjon med dypfrossen saed hos geit. Proc. 12th Nord Vet. Cong. Reyhjavik. DII3, 147-148.
- Hiroe K., Tomizuka T., 1966. Effect of high environmental temperature on the semen production in domestic animals. *Bull. Nat. Inst. Anim. Ind. (Chiba)*, 9, 27-35.
- Hoffman B., Leidl W., Karg H., 1972. Seasonal rhythm of reproduction in the male goat. Proc. 7th Intl Cong. Anim. Reprod. A. I., Munich, Vol. 3, 2065-2068.
- Iritani A., Nishikawa Y., 1961. Studies on the egg-yolk coagulating factors in goat semen. II Properties of the coagulating factor and influential conditions for coagulation. Proc. Siver Jubilee Lab. Anim. Husbandry, Kyoto University, 97-104.
- Iritani A., Nishikawa Y., 1963. Studies on the egg-coagulating enzyme in goat semen. IV. On the position of yolk constituents attacked by the coagulating enzyme. *Jap. J. Anim. Reprod.*, 8, 113-117.
- Iritani A., Nishikawa U., Fukuhara R., 1961. Studies on the egg-yolk coagulating factor in goat sperm. I. Localization of coagulating factors and decline of pH following coagulating. Proc. Siver Jubilee Lab. Anim. Husbandry, Kyoto University, 89-96.
- Labbé C., Blesbois E., Leboeuf B., Guillouet P., Stradaoli G., Magistrini M., 2003. Technologie de la conservation du sperme chez plusieurs vertébrés domestiques : protection des lipides membranaires, intégrité du noyau et élargissement des méthodes. (soumis pour publication).
- Lall H.K., 1947. Some common breeds of goats in India. III. *Indian Fmg*, 8, 322-327.
- Laubser P.P., van Niekerk C.H., Botha L.J.J., 1982. Seasonal changes in sexual activity and sperm quality in the Angora ram. 1. Libido and male hormone concentrations. *S. Afr. J. Anim. Sci.*, 13, 131-133.
- Leboeuf B., 2001. Insémination artificielle caprine : état de l'art. III Congresso Iberico de Reproducao Animal, Porto, 6, 7 et 8 de Julho de 2001, 89-107.
- Leboeuf B., Guillouet P., Batellier F., Bernelas D., Bonné J.L., Forgerit Y., Renaud G., Magistrini M., 2003. Effect of native phosphocaseinate on the in vitro preservation of fresh semen. *Theriogenology* (sous presse).
- Lowe M.E., Kaplan M.H., Jackson-Grusby L., D'Agostino D., Grusby M., 1998. Decreased neonatal, dietary fat absorption and T cell cytotoxicity in pancreatic lipase-related protein 2-deficient mice. *J. Biol. Chem.*, 273, 31215-31221.
- Masaki J., Masuda H., 1968. Seasonal variations in glycerol phosphorylcholine (GPC) content and related characteristics in goat semen. In 5th Intl Cong. Anim. Reprod. A. I., Paris, 22-26 June, Vol 1, 301-303.
- Maxwell W.M.C., Salamon S., 1993. Liquid storage semen: a review. *Reprod. Fertil. Dev.*, 5, 613-638.
- Murugaiyah M., 1992. Changes in the semen characteristics of Kambing x Katjan crossbreed buck under hot and

humid environmental temperatures. In : Lokeshar R.R. (ed), Recent Advances in Goat Productions. Proc. 5th Intl Conf. on Goats, New-Delhi, March 2-8, 1126-1129.

Nunes J., 1982. Etude des effets du plasma séminal sur la survie in vitro des spermatozoïdes de bouc. Thèse de Doctorat, Université Pierre et Marie Curie, Paris, 33 p.

Orgeur P., Mimouni P., Signoret J.P., 1990. The influence of rearing conditions on the social relationship of young male goats (*Capra hircus*). Appl. Anim. Behav. Sci., 27, 105-113.

Ortavant R., 1977. Photoperiodic regulation of reproduction in the sheep. In : 'Management of Reproduction in Sheep and Goats' Symposium, Madison, 24-25, July, 58-71.

Pelletier J., Chemineau P., Delgado J.A., 1988. Seasonality of sexual activity and its photoperiodic control in the adult ram and he-goat. Proc. 11th Intl Cong. Anim. Reprod. A.I., 25-30 June 1988, Dublin, Vol 5, 211-219.

Pellicer M.T., 1995. Purificación y caracterización del componente de la secreción bulbouretral de macho cabrío implicado en el deterioro de la calidad de los espermatozoïdes diluidos en leche. Tesina de Licenciatura, Universidad de Murcia, 200 p.

Pellicer M.T., Combarous Y., 1998. Deterioration of goat spermatozoa in skimmed milk-based extenders as a result of oleic acid released by the bulbourethral lipase BUSgp60. J. Reprod. Fertil., 112, 95-105.

Pomares C.C., Stojanov T., Eppleston J., Maxwell W.M.C., 1994. Effect of glutathione peroxidase on the survival of goat and ram spermatozoa during liquid storage. Proc. 7th Intl Symp. on Spermatology, Cairns, 9.24 (abstract).

Restall B.J., 1991. Goat production in the Asian humid tropics. In : Norton B.W. and Saithanoo S. (eds), Proc. Intl Conf., Hat Yai, Thailand, May 1991, 74-83.

Ritar A.J., Salamon S., 1982. Effects of seminal plasma and its removal and of egg yolk in the diluent on the survival of fresh and frozen-thawed spermatozoa of the Angora goat. Aust. J. Biol. Sci., 35, 305-312.

Ritar A.J., Mendoza G., Salamon S., White I.G., 1992. Frequent semen collection and sperm reserves of the male Angora goat (*Capra hircus*). J. Reprod. Fert., 95, 97-102.

Rouger Y., 1974. Etude des interactions de l'environnement et des hormones sexuelles dans la régulation du comportement sexuel des Bovidae. Thèse de Doctorat Sciences Naturelles, Université de Rennes, 197 p.

Roy A., 1957. Egg-yolk coagulating enzyme in the semen and Cowper's gland of the goat. Nature, 179, 318.

Salamon S., Ritar A.J., 1982. Deep freezing of Angora goat semen: Effects of diluent composition and method and rate of dilution on survival of spermatozoa. Aust. J. Biol. Sci., 35, 295-303.

Saumande J., Rouger Y., 1972. Variations saisonnières des taux d'androgènes dans le plasma de sang périphérique chez le bouc. C.R. Acad. Sc., Paris, 274, 89-92.

Sias B., 2000. Etudes des lipases pancréatiques apparentées de type 2 (PLRP2): Clonage, production, caractérisation biochimique et cinétique. DEA Nutrition aspects moléculaires et cellulaires, Université Aix-Marseille II.

Signoret J.P., Cohen-Tannoudji J., Gonzalez R., 1990. Effect of socio-sexual interactions on endocrine secretions in the domestic sheep. In : Balthazart J. (ed), Hormones and Behaviour in Vertebrates. 2 Behavioural in males and females - social interactions and reproductive endocrinology, Vol 9, 188-200. Comp Physiol. Base Karger.

Singh M.P., Sinha A.K., Singh B.K., 1995. Effect of cryoprotectants on certain seminal plasma attributes and on the fertility of buck spermatozoa. Theriogenology, 43, 1047-1053.

Smith A.H., Polge C., 1950. Survival of spermatozoa at low temperatures. Nature (London), 166, 668-671.

Stojanov T., Pomares C.C., Maxwell W.M.C., Eppleston J., 1994. Effect of cytochrome c on the survival of ram and goat spermatozoa during liquid storage. Proc. 7as Jornadas Internacionales de Reproduccion Animal, Murcia, 6-9 Julio, 333 (Abstract).

Thirstrup K., Verger R., Carriere F., 1994. Evidence for pancreatic lipase subfamily with new kinetic properties. Biochemistry, 33, 2748-2756.

Tuli R.K., Holtz W., 1992. The effect of season on seminal characters in Boer goat bucks in the Northern temperate zone. In : Recent Advances in Goat Productions. Proc. 5th Intl Conf. on Goats, New-Delhi, March 2-8, Abstract n° 1195.

Tuli R.K., Holtz W., 1994. Effect of glycerolization procedure and removal of seminal plasma on post-thaw survival and got-release from Boer goat spermatozoa. Theriogenology, 42, 547-555.

Tuli R.K., Schmidt-Baulain R., Holtz W., 1991. Influence of thawing temperature on viability and release of glutamic oxaloacetic transaminase in frozen semen from Boer goats. Anim. Reprod. Sci., 25, 125-131.

Waide Y., Niwa T., Asanuma R., 1977. Studies on the preservation of liquid and frozen semen of domestic animals. III. Viability and fertility of frozen goat spermatozoa. Jap. J. Anim. Reprod., 23, 129-137.

Walkden-Brown S.W., Restall B.J., Norton B.W., Scaramuzzi R.J., 1994a. The 'female effect' in Australian cashmere goats: effect of season and quality of diet on the LH and testosterone response of bucks to oestrous does. J. Reprod. Fertil., 100, 521-531.

Walkden-Brown S.W., Restall B.J., Taylor W.A., 1994b. Testicular and epididymal sperm content in grazing cashmere bucks: seasonal variation and prediction from measurements in vivo. Reprod. Fertil. Dev., 6, 727-736.

Yokoki Y., Ogasa A., 1977. Effects of hypothermia on semen production in goats. Jap. J. Anim. Reprod., 23, 93-98.

Abstract

Production and storage of goat semen for artificial insemination.

Research on goat semen preservation is reviewed with regards to semen production and methods of preservation.

The methods of increasing semen production should consider the environmental influences on reproduction in the buck. In he-goat, sexual behaviour, sperm production and sperm quality are influenced by photoperiodic changes. The use of artificial photoperiodic cycles can help to control reproductive activity in bucks and to increase the number of semen doses produced during the buck's life. To maximize the amount and quality of spermatozoa, a selection of suitable donors from young males is necessary.

A specific problem in the preservation of goat semen is the detrimental effect of seminal plasma on the sub-

sequent viability of spermatozoa in vitro. The causative agent is an enzyme from the secretions of the bulbourethral gland, which interacts with egg yolk and milk constituents present in the diluents.

In goats, the lack of a reliable method for short term storage of semen is a limiting factor especially in centers without storage facilities for frozen semen. The methods reviewed for processing and freezing semen differ in several aspects: the use of ejaculates with or without seminal plasma, the type and composition of diluent, the method of dilution, the presence or absence of glycerol, the time of equilibration, and the packaging of spermatozoa in straws or pellets.

LEBOEUF B., RESTALL B., SALAMON S., 2003. Production et conservation de la semence de bouc pour l'insémination artificielle. INRA Prod. Anim., 16, 91-99.

