

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique.

جامعة البليدة 1

Université Blida 1.

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Biologie des Populations et des Organismes.



Mémoire de fin d'études en vue de l'obtention du diplôme de Master 2.

Option : Biologie et Physiologie de la Reproduction.

Thème

Etude du sperme du bouc réfrigéré ajouté de dilueurs.

Soutenu le 20 /09 /2020

Présenté par : M^{lle} ABED Taous.

Devant le Jury :

Mr. KAIDIR

Professeur

ISV. U.B-1

Président.

Mme. BENAZZOUZ

MAA

SNV.U. B-1

Examinatrice.

Mr. YAHIA.A

MCA

ISV. U.B-I

Promoteur.

2019/2020

Remerciements

Je tiens de remercier les membres du jury ,tout en espérant qu'ils trouveront la qualité et la clarté qu'ils attendent :

Mr ,KAIDI .R ,qui nous a fait l'honneur de présider ce jury de thèse .

Mme BENAZZOUZ ,qui a accepté d'examiner ce travail.

J'adresse mes vifs remerciements à Mr, YAHIA .A, pour son encadrement , sa disponibilité et sa gentillesse .

Et surtout , je saisis cette occasion pour remercier tous les enseignants de la session BPR (vétérinaire),pour leurs efforts et dévouement .

Dédicace

Je dédie ce modeste travail à mes enseignants, à ma famille et à tous ceux qui m'encouragent
et me soutiennent durant tout mon parcours.

Tables des matières	
Liste des abreviations	
Listes des tableaux	
Liste des figure	
Resumé	
Introduction	1
Partie bibliographique	3
I.Fonction de la reproduction chez le bouc.....	3
1.Les testicules	3
2.Les voies spermatique	3
2.1.Les tubes séminifères	3
2.2.Epididyme.....	4
2.3.Le canal défèrent.....	4
3.Les glande annexes.....	4
3.1.Rôle et propriétés des glandes annexes chez le bouc.....	4
4.Les spermatozoïdes.....	5
5.Durée et productivité de la spermatogénèse.....	8
6.Le plasma séminal.....	9
7.Contrôle neuroendocrinien de la spermatogénèse	10
7.1.L'axe hypothalamo-hypophysaire.....	10
7.1.1.Rôle de la FSH.....	10
7.1.2.Rôle de la LH.....	11
7.1.3.Rôle de la testostérone	11
II.Production de la semence	12
1.Collecte de la semence	12
1.1.Réalisation de la collecte a moyen du vagin artificiel	12
1.1.1Le vagin artificiel	12
1.1.2.Les intérêts de la collecte au vagin artificiel	13
1.1.3.La préparation du vagin artificiel	13

1.2.La récolte par électro-éjaculation.....	13
2. Examen du sperme	14
2.1 Examens macroscopiques.....	14
2.1.1.Volume.....	14
2. 1.2.La couleur du sperme.....	15
2.1.3. La consistance et l'aspect du sperme	15
2.1.4.La mesure du p H	15
2.2.Examen microscopique du sperme:.....	16
2.2.1. La concentration	16
a. Appréciation visuelle directe de la consistance de l'éjaculat.....	16
b. Le comptage direct par hématimètre.....	16
c.La spectrophotométrie.....	17
2.2.2.La motilité.....	18
a. La motilité massale des spermatozoïdes.....	18
b. La motilité individuelle des spermatozoïdes.....	19
2.3. Examen morphologique.....	20
a. Coloration totale	21
b .Coloration vitale.....	21
2.4. Examenbactériovirologique	22
3. Conservation de la semence	22
3.1. L'enzyme de coagulation du jaune d'œuf (EYCE).....	22
3.2. La protéine SBU III.....	23

3.3. Plasma séminal et lavage du sperme.....	24
3.3.1. Le lavage de la semence du bouc.....	24
3.3.4.1. Qualités des milieux de dilution.....	25
4. Dilution du sperme.....	25
3.4.1. Qualités des milieux de dilution.....	25
3.4.2. Nature des milieux de dilution.....	26
3.4.3. Le taux de dilution.....	27
4. Conservation et conditionnement	27
4.1. Conservation à court terme	27
4.2. Conservation à long terme	27
4.2.1. Phase de refroidissement	28
4.2.2. Phase de conditionnement	28
4.3. Cryoconservation de la semence	29
4.3.1. Les agents cryoprotecteurs.....	30
4.4. La conservation a l'état liquide.....	31
III. Synchronisation des chaleurs	32
1. Méthode de synchronisation des chaleurs	32
IV. Insémination artificielle	34
1. Définition	34
1.1. Historique	34
2. Avantages et inconvénients	34
2.1. Avantages	34
2.1.1. Avantages sanitaires	34
2.1.2. Avantage d'ordre génétique	35
2.1.3. Avantage d'ordre économique	35
2.2. Inconvénients	35

3. Technique de l'insémination artificielle	36
3.1. Moment de l'IA	36
3.2. Procédé d'IA	36
3.2.1. Particularités anatomo-physiologiques chez la chèvre	36
3.2.2. Réalisation pratique de l'insémination artificielle	37
3.3. Lieu de dépôt de la semence	37
4. Paramètres influençant le taux de réussite de l'insémination artificielle	38
4.1. Variables d'étude	38
4.2. Facteurs intrinsèques liés au mâle	39
4.2.1 Qualité de la semence	39
4.2.2 Caractéristiques du mâle	39
4.3. Facteurs intrinsèques liés à la femelle	40
4.3.1 Carrière de la femelle	40
3.2 .Production laitière	40
3.3 Poids, Note d'Etat Corporel (NEC)	41
4. Facteurs extrinsèques	41
4.1. Facteurs liés à l'insémination	41
4.2. La préparation des paillettes	41
4.3. Déroulement de l'insémination	42
4.4. Habileté de l'inséminateur.....	42
4.5. Heure de retrait d'éponge	43
4.6. Année et saison	43
4.6. Elevage et le système d'élevage	44
5. Paramètres génétiques de la réussite de l'insémination	44
Synthese des articles scientifiques	
1. Traitement général du sperme.....	45
1.1. Plasma séminal.....	45
1.2. Dilution et concentration des spermatozoides.....	46

3.Congélation et décongelation du sperme	47
3.1.Congélation	47
3.2.Décongélation.....	48
4.Diluants de cryoconservation et cryoprotecteurs.....	49
4.1.Diluants.....	49
4.2.Osmolalité	50
4.3. pH et systèmes tampons	50
4.4.Sucres	52
5.Cryoprotecteurs	54
6. Conservation de la semence à l'état liquide.....	57
7.Conclusion	58
8.Recommandation.....	59
Références Bibliographiques .	

Listes des figures :

Figure 1 : Structure histologique du tube séminifère.....	03
Figure 2 : Structure du spermatozoïde	07
Figure 3 : Collecte de sperme avec un vagin artificiel	12
Figure 4 : Electro éjaculateurs	12
Figure 5 : Hématimètre : cellule de malassez.....	17
Figure 6 : Conditionnement de la semence.....	29
Figure 7 : congélation et stockage de paillettes	30
Figure 8 : schéma représentant le protocole de synchronisation des chaleurs chez la chèvre.....	33
Figure 9 : Matériel d'insemination artificielle	37
Figure 10 : Contention et insémination artificielle chez la chèvre	38

Liste des tableaux

Tableau 1 : Caractéristiques de la semence de bouc et de sa production.....09

Tableau 2 : la description de la motilité massale des spermatozoïdes.....18

Liste des abréviations

IA : Insémination artificielle.

LDL: Low density lipoprotein

EYCE : Egg yolk coagulation enzyme.

DSP : Daily Sperm Production.

AMH : Anti- Müllerian Hormone .

APB : Androgen Binding Protein .

FSH : Follicle Stimulating Hormone.

GnRH: Gonadotrophin Releasing Hormone.

LH: Luteinising hormone .

CASA :Computer Assisted Sperm Analysis.

KRPG : Krebs-Ringer Phosphate-Glucose .

PLRP2 : lipases pancréatiques apparentées de type 2 .

SGV : Sécrétions des glandes vésiculaires .

IVT : Illinois Variable Temperature.

ECG : *equine Chorionic Gonadotrophin*.

PMSG :Pregnant Mare Serum Gonadotropin.

PGFa : prostaglandine F2a.

SBU III : Sécrétions bulbo-urétrales III .

BUSgp60 : Sécrétions bulbo-urétrales glycoprotéine 60.

Résumé

A travers cette synthèse des articles scientifiques, on vise à comparer et optimiser les techniques de cryoconservation de la semence caprine provenant de la littérature. Cette étude traite les effets du plasma séminal, les milieux de conservation, les cryoprotecteurs, la dilution, la vitesse de refroidissement, et le taux de décongélation du sperme spécifiques au caprin et met à jour les informations relatives à la cryoconservation du sperme de caprin, en mettant l'accent sur les particularités propres à l'espèce. Selon les auteurs l'influence du plasma séminal, de la glycérolisation et de la concentration des cryoprotecteurs (jaune d'œuf, lait, glycérol) sur la qualité de la semence décongelée ne sont pas négligeables ainsi que l'importance du retrait du plasma séminal lorsque des concentrations plus élevées de jaune d'œuf (>1,5 %) sont utilisés. En présence de tréhalose dans le milieu de dilution (motilité totale 78%, motilité progressive 61 %, la vitesse de parcours 96 m/s) alors qu'en son absence (motilité totale 62 %, motilité progressive 49 %, la vitesse de parcours 81 m/s) . 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.

Mots clés : caprin ; cryoconservation ; sperme ; diluant ; congélation.

Abstract

Through this synthesis of scientific articles, we aim to compare and optimize the cryopreservation techniques of goat semen from the literature. This study addresses the effects of semen plasma, storage media, cryoprotectants, dilution, cooling rate, and semen thawing rate specific to goats and updates the information related to goat semen cryopreservation, with emphasis on species-specific particularities. According to the authors, the influence of seminal plasma, glycerolization and concentration of cryoprotectants (egg yolk, milk, glycerol) on the quality of thawed semen are not negligible as well as the importance of seminal plasma withdrawal when higher concentrations of egg yolk (>1.5%) are used. In presence of trehalose in the dilution medium (total motility 78%, progressive motility 61%, travel speed 96 μ m/s) whereas in its absence (total motility 62%, progressive motility 49%, travel speed 81 μ m/s) . Semen is stored in liquid state at 4°C. Fertility decreases after 12 hours of storage.

Key words: goat; cryopreservation; sperm; diluent ; freezing.

ملخص

من خلال هذا التوليف للمقالات العلمية ، نهدف إلى مقارنة وتحسين تقنيات الحفظ بالتبريد للسائل المنوي للماعز من الأدبيات. تتناول هذه الدراسة آثار بلازما السائل المنوي ، ووسط التخزين ، والحماية من التجمد ، والتخفيف ، ومعدل التبريد ، ومعدل ذوبان السائل المنوي الخاص بالماعز ، وتحديث المعلومات المتعلقة بحفظ السائل المنوي للماعز ، مع التركيز على الخصائص الخاصة بالأنواع. وفقاً للمؤلفين ، تأثير البلازما المنوية ، والجلسرين ، وتركيز المواد الواقية (صفار البيض ، والحليب ، والجليسرول) على جودة السائل المنوي المذاب ليست مهمة وكذلك أهمية انسحاب البلازما المنوي عند استخدام تركيزات أعلى من صفار البيض (< 1.5%). في وجود التريهالوز في وسط التخفيف (إجمالي الحركة 78% ، الحركة التقدمية 61% ، سرعة التقدم 96 م / ث) بينما في غيابه (إجمالي الحركة 62% ، الحركة التقدمية 49% ، سرعة التقدم 81 م / ث). يتم تخزين السائل المنوي في حالة سائلة عند 4 درجات مئوية. تنخفض الخصوبة بعد 12 ساعة من التخزين.

الكلمات الأساسية: ماعز ؛ الحفظ بالتبريد. الحيوانات المنوية. مادة التخفيف؛ تجميد.

Introduction

La cryoconservation du sperme des mammifères est un processus complexe qui implique la mise en balance de nombreux facteurs pour obtenir des résultats satisfaisants ; on doit non seulement garantir le diluant approprié, le taux de dilution du sperme, la vitesse de refroidissement et la vitesse de décongélation qui lui sont nécessaires. Mais aussi une connaissance approfondie de la physiologie des spermatozoïdes pour maximiser leur viabilité après décongélation et par conséquent la fertilité. Le sperme de caprin est un excellent exemple, car même s'il présente des similitudes avec le sperme des autres espèces domestiques (les types de milieux de cryoconservation, les cryoprotecteurs et le taux de congélation et de décongélation), il requiert une attention particulière pour maximiser la viabilité des spermatozoïdes après décongélation. Par exemple, pour l'interaction entre le jaune d'œuf et les sécrétions des glandes bulbourethrales qui existe pour le sperme de caprin mais pas chez les autres espèces, telles que le taureau, le sanglier ou le bélier **(Roy, 1957 ; Iritani et Nishikawa, 1963 ; Iritani et al, 1964)**.

Suite la baisse de fertilité des femelles (chèvres) après insémination artificielle avec le sperme de bouc congelée, on a tenté de réaliser une étude d'articles scientifiques portant sur la conservation de sperme de caprin et son impact sur la fécondance des spermatozoïdes.

Cette comparaison des articles scientifiques met à jour les informations rapportées par les auteurs, relatives à la cryoconservation du sperme caprin , en mettant l'accent sur les particularités propres à l'espèce. Parmi les sujets abordés, on cite les effets du plasma séminal de caprin pendant la cryoconservation, la dilution et la concentration du sperme, les méthodes de congélation et de décongélation, les composants des diluants de cryoconservation, et les cryoprotecteurs récemment étudiés.

Partie bibliographique

I.Fonction de la reproduction chez le bouc

1.Les testicules

Les testicules sont pourvus d'une fonction exocrine ou spermatique et d'une fonction endocrine (synthèse de l'androgène par les cellules de Leydig, synthèse d'oestrogènes , de l'Anti- Müllerian Hormone (AMH), de l'Androgen Binding Protein (ABP) et de l'inhibine par les cellules de Sertoli). Le testicule est recouvert par une membrane fibreuse, résistante, non élastique appelée albuginée (**Barone,2001**).

2.Les voies spermatique

2.1.Les tubes séminifères

Sont au nombre de deux à quatre par lobule. Ils s'entourent d'une lame basale délimitant contenant parfois des cellules myocytes contractiles. Leur paroi est constituée d'un épithélium stratifié, dont on cite deux types de cellules : les cellules de la lignée germinale et les cellules de Sertoli. L'espace inter -lobulaire est occupé par des cellules endocriniennes ou regroupées appelées cellules de Leydig (**DadouneetDemoulin,2001**).(Figure1).



Figure 1 : Structure histologique du tube séminifère (Albert et Jean, 2001).

2.2.Epididyme

La paroi du canal épидидymaire est faite d'un épithélium pluristratifié entouré de fibres musculaires lisses à contraction péristaltique régulière (Setchell et al ,1994). Cette structure permet à l'épididyme d'accomplir deux principales fonctions :

-Le transport :le transit des spermatozoïdes à travers l'épididyme et sous dépendance de la diminution de la pression intra-luminale en allant vers la queue d'une part ,et de la contraction des cellules musculaires de la paroi, d'autre part. Les spermatozoïdes sont d'abord transportés dans le liquide épидидymaire vers la queue de l'épididyme, où ils seront stockés jusqu'à l'éjaculation .Le transit se déroule sur 10 à 15 jours (Goyal et Memon ,2006). Puis les spermatozoïdes peuvent survivre j'jusqu'à trois semaines dans la queue de l'épididyme (Thibault et Levasseur, 2001).A un temps donné , l'épididyme contient en moyenne 67% du stock des spermatozoïdes dont 73% d'entre eux sont réservés au niveau de la queue (Ritar et al,1992).

-La maturation : cette fonction est assurée par les cellules épithéliales qui secrètent de nombreuses substances assurant la nutrition des spermatozoïdes ,l'acquisition de leur mobilité (glycoprotéines, concentration de la carnitine plasmatique), et de leur pouvoir fécondant. La carnitine est transformée en acétyl carnitine utilisé comme substrat énergétique pour la mobilité spermatique (Jeulin, Lewin,1996).

Les cellules épидидymaires produisent également un facteur décapacitant des spermatozoïdes qui empêche l'expression prématurée de leur pouvoir fécondant (Dacheux F, Dacheux J- L ,2001).

Acquisition de la fécondance :

L'épididyme est l'organe où les spermatozoïdes passent après leur voyage dans les canaux efférents du testicule. Quand les spermatozoïdes sortent de ces canaux, ils sont immobiles et non fertiles ; le passage à travers l'épididyme va les rendre mobiles et fertiles, les transformant ainsi en spermatozoïdes matures.

.3.Le canal défèrent

Il joue ,en plus des contrôle de voie spermatique ,un rôle physiologique assez semblable à celui du canal épидидymaire (Drion et al,1993).

3. Les glandes annexes

Les glandes annexes secrètent ,sous l'effet des androgènes ,des substances nécessaires à la survie des spermatozoïdes (**Vaissaire ,1977**).

Les vésicules séminales sont la source de substrats énergétiques des spermatozoïdes et de protéines de nature diverses .Chez le bouc leurs sécrétions sont riches en fructose ,acide citrique et contiennent également des prostaglandines (**Dacheux F ,Dacheux J –L ,2001**).

Les produits de sécrétions prostatiques sont riches en ions de zinc ,en acide citrique et en protéines à activité protéasique .

Les glandes de Cowper émettant un fluide clair et visqueux qui sert comme un lubrifiant (**Dacheux F, Dacheux J-L,2001**).

3.1.Rôles et propriétés des glandes annexes chez le bouc

Aux voies spermatiques se lient des formations glandulaires appelées glandes annexes. L'épididyme, les testicules et les glandes annexes font partie de l'appareil génital du bouc .Les glandes annexes comprennent les vésicules séminales, la prostate, les ampoules et les glandes bulbo-urétrales. Elles produisent des fluides et des nutriments qui se mélangent aux spermatozoïdes pour former la semence. Les glandes annexes assurent également le nettoyage de l'urètre avant l'éjaculation (**Craaq , 2009**). Les ampoules servent de lieu de stockage pour les spermatozoïdes avant l'éjaculation (**Baril , 1993**).

Les vésicules séminales, situées de chaque côté de la vessie , sont les glandes annexes les plus actives qui produisent en grande partie le volume du liquide séminal (**Boukhliq,2002**). Les glandes bulbo-urétrales sont toutes petites et situées dans la région caudale de l'urètre (**Baril et al,1993**).

4.Les spermatozoïdes

Le spermatozoïde est le gamète chez les mâles ,c'est la seule cellule programmée pour vivre hors de l'organisme qui l'a produit (Soltner,1993). C'est une cellule hautement spécialisée qui ne grossit plus et ne se divise plus .Découvert au microscope à Delfen 1677 par le Hollandais Van Leeuwenhoek, il est aujourd'hui étudié jusqu'aux moindres détails au microscope électronique (figure2). Sur le plan anatomique il comprend:

Latête:chez le bouc ,elle présente une forme massive ,longue de 8 μ et large de 4,5 μ à 5.Elle est constituée essentiellement du noyau à chromatine dense dont les deux tiers antérieurs sont recouverts par l'acrosome (Thibault,1975).Le segment antérieur de ce dernier contient la «Hyaluronidase» qui digère le matériel unissent les cellules du cumulus oophorus ,tandis que le segment postérieur renferme l'acrosine dont le rôle est la perforation de la zone

pellucide de l'œuf (**Drin et al,1993**).

- **Le col** :c'est une courte partie cytoplasme (2à3μ) contenant une plaque basale ,le centriole proximal ,9 fibres denses disposées autour d'un complexe filamenteux axial (axonème) qui comprend 9 paires de tubules périphériques et une paire de tubule centraux.Le tout s'entoure d'une gaine mitochondriale ,elle-même entourée d'une mince couche cytoplasmique (**Vaissaire,1977**).
- **Le flagelle**: présente, lui-même, trois parties successives :
- **La pièce intermédiaire** : débute au niveau du centriole distal et se termine par un épaississement de la membrane cytoplasmique en partie caudale :c'est l'annulus .Elle contient les éléments fibrillaires présents au niveau du col et des mitochondries disposées en gaine spiralée (**Barone,1978**).
- **La pièce principale** :c'est la partie la plus longue de la queue .A son niveau ,la gaine mitochondriale est substituée par une gaine fibreuse.-
- **La pièce terminale** : ne contient que le filament axial avec une mince membrane remplaçant la gaine fibreuse(**Barone,1978**).

Le flagelle est l'élément moteur du spermatozoïde car les mitochondries assurent les phosphorylations oxydatives du fructose présent dans le liquide séminal fournissant l'énergie nécessaire aux mouvements de la queue ,tandis que les structures de l'axonème ont des propriétés contractiles ainsi ,les microtubules périphériques sont riches en ATP ase.(**McDonal ,1980 ; Albert et Jean ,2001**)

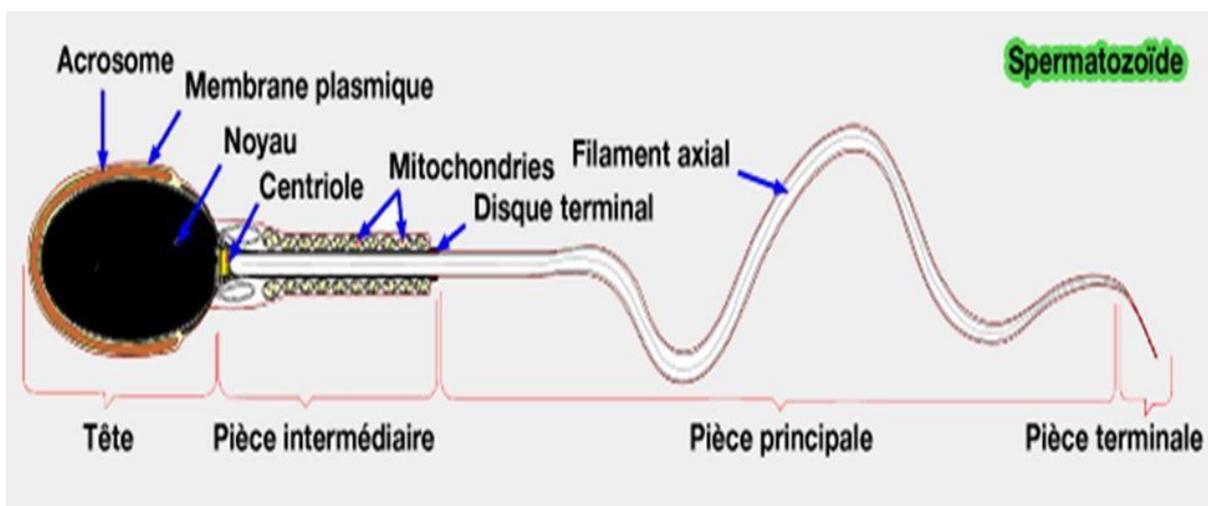


Figure 2 : Structure du spermatozoïde(Internet).

Le produit de l'éjaculation et appelé sperme, il est constitué de deux fractions :

- Une fraction cellulaire constituée par les spermatozoïdes produits par les testicules ;
- Une fraction liquide appelée plasma séminale ,faite des écretion testiculaires et des sécrétions des glandes annexes (**Vaissaire ,1977; Soltner ,1993**).

Chez le bouc, le sperme apparait comme un liquide épais, crémeux et incolore avec une viscosité plus élevée que celle du taureau (**Vaissaire,1977**).

Le volume spermatique varie selon les espèces et même dans l'espèce .Dans ce dernier cas, il sera en rapport en avec l'état physiologique du mâle, l'individu, la race, le développement corporel, le nombre de saillies ou de récolte et la méthode de récolte.

Le bouc a un sperme très concentré mais peu abondant dont le volume est de 1 ml et la concentration est de 3.5×10^9 spermatozoïdes / éjaculat. (**Dérivaux, 1971;Hafez ,1974**).Chez le jeune de 7 à 10 mois ,le volume peut osciller entre 0,2 et 0,5 ml et de 0,6 à 2 ml chez le bouc adulte (**Setchell,1977 ;Corteel,1988**).

4.Durée et productivité de la spermatogénèse

La durée de la spermatogénèse est constante pour une espèce au cours de la vie .Chez le bouc, il faut 52 jours pour obtenir des spermatozoïdes dans la lumière des tubes séminifères. Ensuite, il faut prendre en compte une dizaine de jours supplémentaires pour l'acquisition du pouvoir fécondant. Ainsi, on retiendra que deux mois sont nécessaires pour la formation de spermatozoïdes féconds. (**Gahery C , 2012**).

La production journalière de spermatozoïdes ou DSP (Daily Sperm Production) est de l'ordre de $2,8 \text{ à } 7,3.10^9$ spermatozoïdes par jour et par testicule chez le bouc Alpin (**Leboeuf et al,2003**). La DSP est fonction du rendement des divisions cellulaires, et de la périodicité des divisions des spermatogonies souches qui elle, est fixe. (Thibault et Levasseur., 2001).Le rendements divisions des cellules souches varie notamment avec la saison. (**Delgadillo et al., 1995**).

La semence correspond à la sécrétion des spermatozoïdes dans un liquide appelé plasma séminal . Les principales caractéristiques de la semence de bouc et de sa production sont présentés dans le (**tableau1**).

Tableau1:Caractéristiques de la semence de bouc .(Leboeuf et al , 2003; Memon et al.,2006).

Aspect /Couleur	Variable selon la concentration. Blanc nacré pour une semence de Bouc
Volume (ml) par éjaculat	1,5 ml
Concentration moyenne	4×10^9 (2 à 4)
% de spermatozoïdesmotiles	80 % (70 à 90%)
% de spermatozoïdes	80% (70à90%)
DSO(daily sperm out put)	$2,96.10^9 \pm 0,36$ spermatozoïdes chez les boucs Alpin et Saanen

- Le volume de l'éjaculat est variable selon les saisons ,l'âge et les rythmes de collecte de la semence. **(Manfrediet al ,1998)**. Il est élevé pendant la saison sexuelle **.(Corteel ,1977)**.

- La concentration spermatique est augmentée en dehors de la saison sexuelle **(Corteel.,1977)**.

- L'éjaculation quotidienne de spermatozoïdes (DSO) peut correspondre à 40 et 80 % de la production quotidienne de spermatozoïdes (DSP), lorsque les boucs sont récoltés plusieurs fois par semaine. **(Leboeuf et al,2003)**.

6-Le plasma séminal

Le plasma séminal est un milieu extrêmement complexe qui contient de nombreuses substances ,il a pour rôle de transporter les spermatozoïdes et d'apporter divers éléments essentiels à leur survie. **(Baril et al ,1993)**.

Les sécrétions des glandes annexes forment les $\frac{3}{4}$ du volume séminal .Ce dernier se forme lors de l'éjaculation : les spermatozoïdes quittent la queue de l'épididyme et rencontrent successivement les sécrétions de la prostate, des glandes vasculaires et des glandes bulbo urétrales. **(Courtens et al ,1998)**.

- La prostate apporte entre autre zinc et cholestérol qui sont utilisés par les gamètes.
- Les sécrétions de la glande vésiculaire apportent une grande contribution au volume du plasma séminal .Il est riche en fructose ,la principale source d'énergie pour les gamètes.

- Les sécrétions des glandes bulbo-urétrales sont riches en phospholipase A ,la BUSgp60 ou aussi appelée enzyme de coagulation du jaune d'œuf), et la SBUIII. Les produits de leur

activité enzymatique deviennent toxiques pour les membranes cytoplasmiques. La qualité des spermatozoïdes est alors détériorée. (Pellicer–Rubio et Combarrous ,1998 ;Lebœuf et al,2003). Cette particularité de la semence de bouc donne des contraintes pour sa conservation et maintien de sa qualité après Cryoconservation.

7. Contrôle neuroendocrinien de la spermatogenèse :

La fonction de reproduction est sous le contrôle du système nerveux central par l'intermédiaire de l'axe hypothalamo-hypophysaire. Plusieurs facteurs environnementaux dont la photopériode agissent sur le système nerveux central (Chemineau et Delgadillo, 1994).

7.1. L'axe hypothalamo-hypophysaire

Le complexe hypothalamo-hypophysaire situé à la base du cerveau est formé de l'hypothalamus et de l'hypophyse antérieure (Chemineau et Delgadillo, 1994; Thibault et Levasseur, 2001). Le contrôle de l'activité des gonades fait intervenir les hormones gonadotropes : LH (Luteinizing Hormone) et FSH (Follicule Stimulating Hormone). Elles sont synthétisées par des cellules de l'hypophyse antérieure.

La sécrétion de ces deux hormones est régulée par une neuro-hormone : la GnRH (Gonadotrophin' Releasing Hormone, appelée aussi gonadolibérine) produite par des neurones de l'hypothalamus. Cette dernière est libérée dans les vaisseaux sanguins du système porte irriguant l'hypophyse. La gonadolibérine agit ainsi de façon immédiate sur la sécrétion de LH ; c'est pourquoi les pulses de LH sont directement liés à la pulsativité de la GnRH. Toutefois, l'action de la GnRH sur la libération de FSH est moins marquée. Les profils sécrétoires de GnRH, de LH et de FSH sont influencés par de nombreuses stimulations qui peuvent être d'origines nerveuses (stimuli visuel, olfactif, auditif) ou hormonales (rétrocontrôles, stress par les corticoïdes).

Le déclenchement et le maintien de la spermatogenèse sont sous la dépendance des hormones hypophysaires gonadotropes. Cependant, tandis que la FSH exerce ses effets directement sur l'épithélium des tubes séminifères, la LH exerce son effet stimulateur indirectement, via la testostérone produite par les cellules de Leydig. Mais il est admis que la prolactine intervient également (Dupoy J-P, 1993).

La glande pinéale tient une place importante chez les races photopériodiques, puisque c'est elle qui traduit les effets de la lumière sur les neurones à GnRH (Baril G et al. 1993).

7.1.1.Rôle de la FSH

La FSH assure le bon déroulement de la spermatogenèse en stimulant d'une part la production de testostérone et d'autre part la synthèse de l'ABP par l'intermédiaire des cellules de Sertoli (Vaissaire , 1977).

7.1.2.Rôle de la LH

L'action de la LH est indirecte sur le processus de la spermatogenèse puisqu'elle stimule la sécrétion de testostérone par les cellules de Leydig.

La sécrétion de la FSH et de la LH est contrôlée par un décapeptide hypothalamique : GnRH, de sécrétion pulsatile et de demi-vie courte. La sécrétion de la GnRH est elle-même soumise à l'influence de l'épiphyse et du système nerveux extra hypothalamique. Deux mécanismes de rétrocontrôle long sont parfaitement établis :

-L'inhibine, sécrétée par les cellules de Sertoli sous l'influence conjointe de FSH et de testostérone, déprime la sécrétion hypophysaire de FSH.

-Le taux d'androgènes circulants, d'origine gonadique, freine la sécrétion hypophysaire de la LH (Dadoune , 2001).

7.1.3. Rôle de la testostérone :

- contrôle la différenciation de type mâle sur les organes génitaux embryonnaires,
- détermine le comportement sexuel mâle et le développement des caractères sexuels secondaires,
- stimule la synthèse de l'ABP, en synergie avec la FSH,
- contrôle la spermatogenèse par action directe sur le tube séminifère,
- contrôle la survie et la maturation épидидymaire des spermatozoïdes par stimulation des cellules épидидymaires,
- contrôle l'activité sécrétoire des glandes annexes (ex : fructose par la vésicule séminale),
- exerce un rétrocontrôle négatif sur l'hypothalamus pour la sécrétion deGnRH et sur l'antéhypophyse pour la sécrétion de LH,
- enfin elle exerce une action sur la croissance en favorisant l'anabolisme protéique, la croissance des tissus osseux et le développement des muscles. (Bonne et al, 1988).

II. Production de la semence

1. Collecte de la semence

La collecte du sperme est une opération très importante en insémination artificielle parce qu'elle permet de disposer de semence pour réaliser les doses d'insémination artificielle. La technique de collecte du sperme varie d'une espèce à une autre (**Leborgne et al., 2013**). Chez les ruminants, la collecte est faite à l'aide d'un vagin artificiel ou d'un électro-éjaculateur. La technique la plus adoptée est la collecte dans le vagin artificiel à l'aide d'une femelle en chaleur ou non comme bote-en-train (**Haye et al., 2004; Marichatou et al., 2004**). L'électro-éjaculateur est plutôt utilisé chez les petits ruminants (**Oyeyemi et al., 2000; Bitto et Egbunike, 2012**).

Dans les pays développés, un système de collecte automatique (**Collectis®, France**) a été mis en place depuis les années 2000 (**Barrabes et al, 2008**).

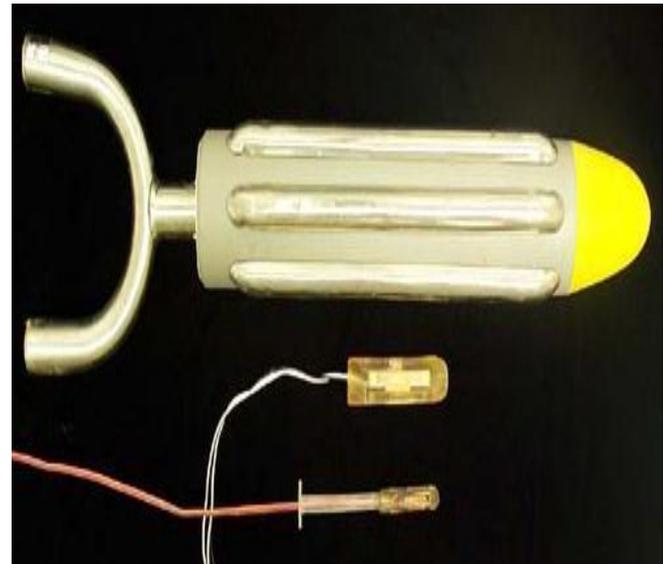
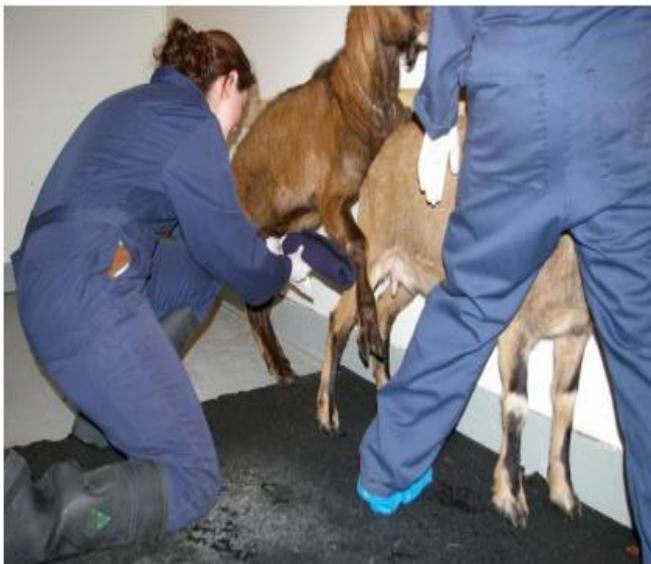


Figure 3 :Collecte de sperme avec un vagin artificiel Figure 4 :Electro éjaculateurs .

1.1. Réalisation de la collecte au moyen du vagin artificiel

1.1.1. Le vagin artificiel

Le principe du vagin artificiel est de reproduire l'ensemble des sensations présentées par les voies génitales femelles lors du coït (chaleur, pression, lubrification), et de recueillir rapidement un éjaculat total et non souillé (**Dumont, 1997**).

1.1.2. Les intérêts de la collecte au vagin artificiel

La Qualité de la semence : La collecte au vagin artificiel donne un éjaculat naturel, induit par une libido nécessaire et suffisante, et produit par un comportement physiologiquement proche du coït. C'est pourquoi elle permet d'obtenir le meilleur sperme possible à un moment donné (**fabrice et al , 2008**).

➤ Elle permet également L'obtention De la totalité de l'éjaculat, et La mesure exacte de l'éjaculat, une meilleure viabilité du sperme en comparaison avec d'autres méthodes et l'absence de sécrétions extérieures.

1.1.3. La préparation du vagin artificiel

Chez les caprins, au moment de la récolte du sperme, la chambre circulaire du vagin artificiel est remplie d'eau à 44 – 45°C en quantité suffisante de manière à créer une pression rappelant celle du vagin naturel (**Hanzen, 2016**).

L'extrémité servant à la pénétration du pénis est enduite d'un lubrifiant, facilitant ainsi l'intromission de l'organe copulateur. Cependant, en excès, celui-là peut s'accumuler dans le tube collecteur et contaminer le sperme rendant les examens de la semence difficiles.

Les températures élevées de l'eau peuvent léser l'organe copulateur du mâle qui, par la suite, refuse d'effectuer des montes. Une pression élevée du vagin artificiel est à éviter, car, elle peut ne pas céder passage au pénis et sera à l'origine d'un éclatement du cylindre interne. En regardant son ouverture, un remplissage correct se traduit par la simulation d'une fente vulvaire (**Hanzen, 2006**).

1.2. La récolte par électro-éjaculation

L'électro-éjaculation permet de provoquer l'éjaculation par une stimulation électrique. Un générateur produit de l'électricité qui est transmise par l'intermédiaire d'électrodes à l'animal. L'interface tissu/électrodes (résistance interne) joue un rôle non négligeable car la stimulation électrique doit parvenir jusqu'aux nerfs pour provoquer l'érection et l'éjaculation. On essaie de stimuler particulièrement les glandes bulbo-urétrales, la prostate et les vésicules séminales (**Stievenart, 1991**).

On utilise, pour cela, une sonde rectale adaptée aux caractéristiques de l'anatomie de l'espèce. Cette sonde, comprenant généralement trois électrodes longitudinales et parallèles,

est introduite dans le rectum et maintenue de façon à assurer un contact étroit avec le plancher durement.

Le protocole d'électro-éjaculation (voltage, intervalles et nombre de stimulations) semble important pour l'obtention d'une semence de bonne qualité et doit être adapté à chaque espèce (**Cameron, 1977**). Chez le bouc, l'émission de 3 ou 4 stimulations de 2,5 à 8 volts provoque l'éjaculation (**Gomes, 1977**).

En comparaison avec la récolte à l'aide de vagin artificiel, il est généralement admis que le volume de l'éjaculat est plus important et de concentration en spermatozoïdes plus faible du fait d'une sur-stimulation des glandes annexes, mais sans diminution de la motilité de ces derniers (**Akusu et al, 1984**).

L'utilisation de cette technique n'est pas préconisée chez l'espèce caprine à cause de l'effet défavorable du plasma séminale du bouc sur la conservation in-vitro des spermatozoïdes (**Nunes, 1982**).

2. Examen du sperme

2.1 Examens macroscopiques

2.1.1. Volume

Après la récolte, la mesure du volume de l'éjaculat s'effectue par la lecture directe à l'aide de graduations du tube de collecte sans tenir compte de sa partie mousseuse (**Baril et al, 1993**).

Selon **Setchell, (1977)** et **Taure, (1988)**, le volume de l'éjaculat varie entre 0,2 et 0,5 ml chez les jeunes boucs de 7 à 10 mois, et entre 0,6 et 2 ml chez les adultes.

La production spermatique chez le bouc de race ARBIA augmente pendant la saison d'été et d'automne, puis elle commence à régresser en hiver et essentiellement au printemps. Et s'annule au mois de mai (**Belhamiti, 2006**)

Le volume de l'éjaculat dépendra de divers facteurs, à savoir, l'âge, la saison et la fréquence de récolte (Hafez, 1987 ; Maxwell et Evan, 1987). Cependant, quand le volume de l'éjaculat augmente ou diminue, ces changements sont, en grande partie, dus aux changements de la quantité des sécrétions épидidymaire et des glandes annexes (**Corteel, 1977**).

Chez les boucs des races saisonnées, le comportement sexuel, le volume testiculaire et la

production spermatique sont influencés par les changements photopériodiques (**Ortavant, 1977 ; Laubser et al, 1982 ; Branca et Cappai, 1989**) Chez le bouc australien de race cachemire, **Walkden-Brown et al, 1994b**, constatent que la reprise 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 qu'une diminution de la quantité de nourriture ingérée.

Les boucs de race Alpine et Poitevine ont un volume d'éjaculat élevé en automne et en hiver, c'est-à-dire pendant la saison sexuelle. Ensuite, le volume diminue pour atteindre des valeurs minimales au printemps et en été, c'est-à-dire en période de repos sexuel (**Leboeuf et al, 2003**).

2. La couleur du sperme

Chez la plupart des espèces animales, la couleur du sperme peut varier du blanc clair au jaune brillant (**Ezekwe, 1988a**).

Chez le bouc, le sperme est de couleur blanc jaunâtre. Cette coloration est due à la présence d'un pigment lipochrome élaboré par la vésicule séminale. La couleur des spermatozoïdes peut être modifiée pour des raisons physiologiques (concentration) mais le plus souvent pathologiques.

- La coloration brunâtre témoigne de la présence d'éléments sanguins dégénérés.
- La coloration bleuâtre résulte d'une faible concentration ou de l'administration de bleu de méthylène.
- Une coloration brunâtre ou grise indique une contamination du tractus génital du mâle (**Hafez, 1987 ; Maxwell et Evans, 1987**).

La consistance et l'aspect du sperme

Chez les caprins, le sperme est un liquide épais, crémeux, inodore et assez visqueux (**Marquis, 1990**). La consistance de la semence est fonction du rapport entre les spermatozoïdes et le plasma séminal. Ainsi, le sperme de forte consistance contient beaucoup plus de spermatozoïdes que celui de faible consistance (**Salamon, 1976 ; Hafez, 1987**).

4 La mesure du PH :

Le pH séminal est mesuré, juste après la récolte, à l'aide d'un pH mètre. Le sperme du bouc est légèrement acide, son pH varie de 6 à 6,8 avec une moyenne de 6,4 (**Vaissere, 1977**).

Cette valeur évolue inversement à celle de la concentration, quand celle-ci augmente, le pH diminue.

Après la collecte, le rythme de diminution du pH permet l'évaluation de la qualité du sperme (**Derivaux Ectors, 1986**). D'une manière générale, les spermatozoïdes forts concentrés et riches

enfructose accusent une diminution plus rapide du pH que les autres du fait de l'accumulation plus rapide d'acide lactique due à une glycolyse plus intense ce qui, indirectement, témoigne leur meilleure qualité .

2.2.Examen microscopique du sperme:

2.2.1. La concentration :

C'est un critère important pour le jugement de la qualité de la semence. L'objectif de cette mesure est de pouvoir déterminer le nombre de spermatozoïdes par millilitre de semence pure en utilisant le minimum de semence possible Elle peut être déterminée directement par comptage des spermatozoïdes au moyen d'une cellule hématimétrique ou indirectement par comparaison visuelle du sperme à des solutions standard, par comptage électronique ou encore par néphélométrie (ou néphélémétrie).

Chez les races saisonnées, la concentration spermatique suit une évolution inverse de celle du volume, elle est élevée en dehors de la saison de reproduction et faible en saison sexuelle .Ces variations sont le reflet de la synthèse et de la sécrétion des glandes annexes. Celles-ci sont stimulées par la testostérone qui est élevée en saison sexuelle et basse en contre saison **(Baril et al, 1993).**

a. appréciation visuelle directe de la consistance de l'éjaculat

L'appréciation de la couleur peut être une méthode empirique pour l'évaluation de la concentration. Ainsi, une couleur jaune très claire signifie une concentration inférieure à 1 milliard de spz/ml.

En revanche, un sperme blanc ivoire peut exprimer une concentration supérieure ou égale à 3 – 4 milliards de spz/ml **(Marquis, 1990).**

Cette pratique n'est toutefois pas recommandée en raison de son assez grande imprécision due à l'appréciation subjective et parce que d'autres techniques précises et d'emploi facile peuvent être utilisées.

b. Le comptage direct par hématimètre :

La numération directe se fait au moyen d'un hématimètre. Ce dernier est constitué d'une lame de verre, creusée d'une petite cuvette dont le fond est garni d'un quadrillage .La totalité de la cellule de malassez est composée de 100 rectangles dont les dimensions sont : Long.= 0,25 mm / larg.= 0,20 mm / Prof. = 0,20 mm ,Le volume total de la cellule est de 1 mm³ (100x2,5 x 0,2 x 0,20), Le quadrillage est donc constitué de 10 bandes verticales (0,25 mm) et de 10 bandes horizontales (0,20 mm) formant ainsi 100 rectangles. Parmi les 100 rectangles

totaux, on trouve 25 rectangles qui sont divisés en 20 petits carrés a fin de faciliter le comptage, chaque rectangle correspond à un volume 100 fois plus faible, soit $0,01 \text{ mm}^3$. Ce type de numération suppose la dilution préalable du sperme dans une solution susceptible de disperser et de tuer les spermatozoïdes : solution de chlorure de sodium à 3 % ou solution de formaldéhyde à 1 % (solution de Hancock). Le taux de dilution dépend de la concentration apparente du sperme.

On conseille une dilution de 1 % pour les spermes de taureau, de bélier et de bouc. **(Hanzen , 2016)**. Il existe différents types d'hématimètre qui se caractérisent notamment par leur surface (S) et la profondeur de leur chambre de numération (P) : Malassez (S: 5 mm^2 , P : 0.2 mm), Thoma (S : 1 mm^2 , P: 0.1 mm), Neubauer (S : 9 mm^2 , P: 0.1 mm) et Türk (S: 9 mm^2 , P: 0.1 mm) .

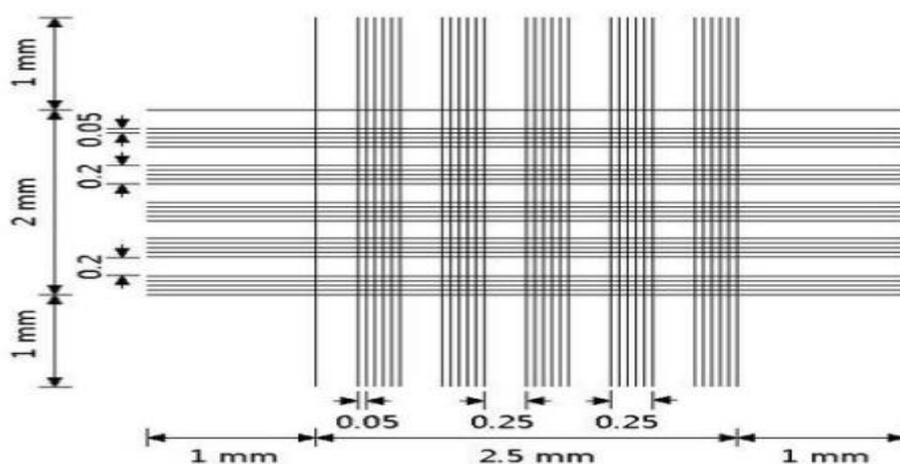


Figure 5 :Hématimètre : cellule de malassez.

c.La spectrophotométrie

Est la technique la plus efficace car elle allie rapidité et précision. Le principe général est de mesurer la densité optique (à une longueur d'ondes de 550 nanomètres) de la solution saline formolée précédente, contenant les spermatozoïdes, et de la comparer à un blanc (ne contenant pas de spermatozoïdes) **(baril et al 1993)**.

Cette méthode est universellement utilisée dans les centres d'IA. Elle consiste à apprécier la concentration en spermatozoïdes en évaluant l'opacité de la suspension au moyen d'un spectrophotomètre ou d'un colorimètre. Cette opacité peut cependant être indirectement augmentée suite à la présence de débris cellulaires. Cette méthode est moins exacte chez les espèces dont le plasma séminal présent de grandes variations d'opacité (verrat, étalon).

La cellule de Thomas (hemocytomètre) offre le double avantage être bon marché et de voir les spermatozoïdes (**Hanzen, 2009**).

2.2.2.La motilité

L'examen de la motilité doit se faire le plus rapidement possible après le prélèvement en le maintenant rigoureusement à une température voisine de 38°C. La progression des spermatozoïdes est habituellement rectiligne. Au cours de leur déplacement, ils subissent une rotation autour de leur grand axe. Dans la queue de l'épididyme, les spermatozoïdes sont immobiles. Leur motilité dépend de leur présence dans un milieu de pH et de température normale, renfermant en quantités adéquates nutriments et ions, conditions offertes une fois qu'ils sont présents dans les sécrétions séminales (**Hanzen , 2009**).

a. La motilité massale

C'est une mesure rapide et facile qui nécessite un examen microscopique de la semence, dès que celle-ci est collectée. Une goutte de sperme pur est déposée sur une lame et placée sur la platine chauffante du microscope (37-38°C) sous un grossissement de 80. L'observation doit être faite très rapidement car la motilité massale du sperme pur, à cette température, diminue rapidement au bout de 15 à 20 secondes.

La mesure est faite en utilisant une échelle qui va de zéro à cinq. (**tableau II**)

Cette technique est suffisamment efficace pour détecter les éjaculats où les spermatozoïdes morts outrès peu mobiles; elle est toutefois trop imprécise pour différencier les éjaculats avec différents pourcentages de spermatozoïdes mobiles ou différentes motilités individuelles (**Maxwell et Evans, 1987 ; Baril et al, 1993**).

Elle dépend essentiellement de trois facteurs :

la concentration, le pourcentage de spermatozoïdes mobiles et de la vitesse de déplacement des spermatozoïdes. Ils doivent être pris en considération dans l'interprétation du score de la motilité massale (**Hanzen,2016**).

Tableau II : la description de la motilité massale des spermatozoïdes (Salamon, 1976).

Note	Mobilité massale	Description
-5	Très bonne	Vagues et tourbillons, mouvements très rapides ; les spermatozoïdes ne peuvent pas être visionner Individuellement

-4	Bonne	Mouvements rigoureux, vagues et tourbillons ne sont pas aussi évidents qu'en score 5.
-3	Faible	Il n'y a pas ou il y a peu de vagues lentes ; les spermatozoïdes peuvent être individualisés. 45-65% des spermatozoïdes sont actifs.
-2	Assez faible	20 à 40% des spermatozoïdes sont actifs ou vivants, leur motilité est très faible. Absence de vagues.
-1	Très faible	Très peu de spermatozoïdes montrent des signes de vie sans mouvements progressifs.
-0	Absence	Tous les spermatozoïdes sont morts.

b. La motilité individuelle des spermatozoïdes

Cette évaluation est réalisable en même temps que l'estimation du pourcentage des spermatozoïdes mobiles, d'ailleurs, elles sont effectuées dans les mêmes conditions de grossissement et de température (**Hafez, 1987 ; Baril et al, 1993**). L'examen de la motilité individuelle "progressive motility" sera, préférentiellement, réalisé une fois après dilution (10 à 40 fois) du sperme dans un dilueur ou dans du sérum physiologique préalablement chauffé. Ces milieux seront idéalement préparés avant l'examen pour éviter toute modification de pH, préjudiciable à la motilité des spermatozoïdes. La motilité sera déterminée au moyen d'un microscope à contraste de phase en plaçant une goutte de sperme diluée entre lame et lamelle. Trois à cinq champs proches du centre de la goutte, seront ainsi examinés au grossissement 200 à 500 et la moyenne calculée. La motilité d'un spermatozoïde peut être considérée comme bonne quand il traverse le champ du microscope relativement rapidement avec des mouvements de rotation de la tête (spermatozoïdes fléchant ou traceurs). Certains spermatozoïdes présentent des mouvements circulaires imputables à l'implantation abaxiale de leur queue. D'autres se déplacent de

manière curviligne ou plus lentement. Les analyseurs d'image de type CASA (Computer Assisted Sperm Analysis) permettent de quantifier de manière plus précise la nature et la vitesse des déplacements. Un sperme de très bonne qualité (4) doit posséder au moins 80 à 100 % de spermatozoïdes mobiles. Un sperme de bonne qualité (3) aura 60 à 79 % de spermatozoïdes mobiles. Un sperme de qualité correcte (2) aura 40 à 59 % de spermatozoïdes mobiles et enfin un sperme de faible qualité (1) aura moins de 40 % de spermatozoïdes mobiles. (**Hanzen,2009**).

L'examen de la motilité individuelle est intéressant car, il fournit indirectement des informations intéressantes sur l'intégrité de la membrane du spermatozoïde et son intégrité morphologique. Ainsi, un pourcentage élevé de spermatozoïdes mobiles joint à un pourcentage élevé de spermatozoïdes morts donnera à penser à une mauvaise manipulation du sperme plus qu'à un sperme anormal. De même une faible motilité est souvent corrélée avec un pourcentage élevé de formes anormales ou de spermatozoïdes morts (**Hanzen,2016**). Chez les races à activité sexuelle saisonnière, le taux des spermatozoïdes mobiles est élevé pendant la saison sexuelle et faible en dehors de celle-ci (**Delgadillo, 1990**). Pendant la saison de reproduction, la motilité spermatique est élevée ; ainsi, un éjaculat moyen contient 85 à 95% de spermatozoïdes normaux dont leur motilité individuelle est la plus élevée de l'année. En général, les variations saisonnières de la motilité, évaluées en conditions définies, sont associées aux variations saisonnières correspondantes de la fertilité (**Corteel, 1976a**).

Les deux tests précédents sont suffisamment précis pour juger ou non si les éjaculats doivent être écartés sur la base de faibles pourcentages de spermatozoïdes mobiles ou de faible motilité. Ils sont généralement utilisés pour apprécier la qualité de la semence après congélation et dégel. Toutefois, même s'ils sont liés à la fertilité de la semence, ils sont incapables de la prédire avec précision; d'autres tests sont donc nécessaires (**baril et al, 1993**)

2.3. Examen morphologique

C'est le second test qualitatif après la motilité. Il apprécie la qualité du sperme au travers du nombre de spermatozoïdes atypiques, qui indique une baisse de sa viabilité. Ce test est réalisé en recourant aux différentes préparations colorées.

L'examen morphologique nécessite la coloration du sperme. Pour ce faire, une goutte de sperme est mélangé a une goutte de colorant, et déposée à l'extrémité d'une lame et étendue en couche mince au moyen d'une autre lame inclinée à 45°. La préparation est séchée à l'air libre en quelques minutes. Le frottis est ensuite fixé par immersion dans une solution d'alcool

méthylène ou dans une solution de formaline à 5 %. La fixation à l'air libre est également possible comme celle consistant à passer rapidement le frottis au-dessus d'une lampe à alcool. Tout choc thermique sera néanmoins évité pendant ces préparations. Certaines colorations ont pour objet de mieux faire apparaître la morphologie du spermatozoïde (coloration totale), les autres dites vitales permettent de différencier les spermatozoïdes morts et vivants.

a. Coloration totale

La coloration totale peut être simple fournissant une coloration uniforme des spermatozoïdes. Dans ce cas, les colorants suivants peuvent être utilisés : bleu de méthylène, bleu de toluidine, violet de gentiane et la fuschine.

La coloration totale est dite double en utilisant les colorations Giemsa et Williams. Ces dernières font mieux apparaître les différences structurales au niveau de la tête, de l'acrosome ou de la pièce intermédiaire.

La coloration à l'encre de Chine est dite négative car les spermatozoïdes apparaissent en clair sur le fond noir de l'encre de Chine. Cette coloration identifie bien la forme de la tête ainsi que la présence éventuelle d'une gouttelette protoplasmique. (**Derivaux et Ectors, 1986 ; Hafez, 1987**).

b. Coloration vitale

Cette coloration a pour principe d'utiliser un colorant qui ne traverse que les membranes des cellules mortes (éosine, rose Bengale, vert de Crésyl) et un colorant de fond qui facilite la lecture (bleu de méthylène, nigrosine). La coloration éosine-nigrosine est classiquement la plus utilisée. Tout en évitant la formation d'artefacts (**Hanzen, 2016**), cette technique permet la détermination du pourcentage des spermatozoïdes morts par rapport aux vivants.

Les frottis sont réalisés en mélangeant une goutte de colorant avec une goutte de sperme. Cependant, l'acrosome ne peut pas être évalué sur ce type de préparation, et seule une lecture, en milieu humide de préparation des gamètes fixés au formol en contraste de phase, le permet (**Chavette, 1992**).

Pour déterminer le taux de cellules mortes et celles avec anomalies structurales, la lame est placée sur la platine chauffante du microscope à 37 – 38°C et examinée à la lumière directe, pour au moins 150spz dans différents champs de la même préparation (**Baril et al, 1993**). Tous les spermatozoïdes colorés en totalité ou en partie sont considérés comme morts au moment de la coloration.

D'après **Corteel, 1981**, l'incidence des anomalies morphologiques des spermatozoïdes augmente en dehors de la saison sexuelle ou après exposition des mâles à des températures ambiantes élevées. Cependant, la fertilité du bouc sera affectée, surtout si leur proportion dépasse 20% (**Marquis, 1990**).

Examen bactériovirologique

Il doit être réalisé lorsque l'on suspecte une infection du tractus génital et plus spécialement lorsque le sperme est pollué par des polynucléaires. Normalement, le sperme est stérile mais il peut être contaminé par les conditions de la récolte. Au nombre des germes saprophytes, on note *Bacillus subtilis*, *Corynebacterium*, *Enterocoques*, *Proteus*, *Entérobactéries*. L'identification d'un germe ne le rend pas nécessairement responsable de l'affection. L'examen doit être corrélé avec les autres examens macroscopiques et microscopiques (**Hanzen, 2006**).

3. Conservation de la semence

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-urétrales avait un effet négatif sur la survie in vitro des spermatozoïdes en présence de constituants lactés du dilueur.

3.1. 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 bouc sont débarrassés du plasma séminal

par lavage après dilution dans un milieu bas e de jaune d'œuf et conservé 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.

3.1. La protéine SBU III

Cette protéine est sécrétée par les glandes bulbo-uréthrales. **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 (KRPG). 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 épидидymaires en présence de dilueur à base de lait écrémé.

Pellicer et Combarous (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**).

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-uréthrales (SBU). Les sécrétions des glandes vésiculaires (SGV) induisent une réaction acrosomique chez seulement 5 % des spermatozoïdes. Mais un mélange des deux sécrétions (SGV = 2,5µl/ml + SBU 2,5µl/ml) induit seulement 26,7 % de réaction acrosomique, ce qui montre l'effet protecteur des sécrétions vésiculaires (**Courtens et al, 1984**). Ainsi, l'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 Busgp 60 présentait une activité sur le jaune d'œuf.

•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 des 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 Salamon1 ,982). Mais l'élimination du plasma séminal n'est pas nécessaire à la survie des spermatozoïdes conservés à 4 °C (Leboeuf *et al* , 2003).

3.3.Le lavage de la semence du bouc

Le lavage de la semence dès la collecte est réalisé en suspendant le sperme dans une solution Krebs Ringer-Phosphate (solution «de lavage») contenant du glucose, puis en centrifugeant le mélange pour éliminer le plasma séminal. Deux lavages successifs sont préférables à un seul lavage.

Au moment de la collecte, l'éjaculat est dilué avec la solution de lavage de façon à obtenir une concentration de 400×10^6 de spermatozoïdes/ml de la suspension à centrifuger. Le tube de collecte est alors placé dans une centrifugeuse pendant 15 minutes à 20°C, à une accélération de 500-600 g. Après quoi, le surnageant est éliminé avec une pipette et un nouveau volume, identique, de solution de lavage est ajouté; le tube est centrifugé une seconde fois de la même manière précédemment citée.

3.4. Dilution du sperme

La réussite de l'IA dépend, principalement, de la qualité de la semence. Les inséminations artificielles réalisées avec de la semence fraîche ont un taux de succès très satisfaisant suivant les espèces et les techniques d'insémination (Cseh et al, 2012). La semence cryoconservée présente des taux de succès plus variables, principalement, dues aux

dommages subis par les spermatozoïdes durant le processus de congélation (**Hammerstedt et al, 1990; Bailey et al, 2000**).

Elle permet de réaliser, à partir d'un seul éjaculat, l'insémination d'un nombre important de femelles et assurer la survie des spermatozoïdes pendant un certain temps (Marquis, 1990).

Les dilueurs de semences sont des solutions aqueuses servant à augmenter le volume d'un éjaculat pour l'amener à la concentration de conservation souhaitée. Afin d'être efficace, le dilueur doit apporter les nutriments nécessaires au maintien métabolique des spermatozoïdes (glucose ou fructose), conserver un pH (Tris, Hepes) et une osmolarité physiologique (NaCl, KCl), empêcher la prolifération bactérienne (antibiotiques) et faciliter l'ajout d'agent cryoprotecteur (**Gadea, 2003**).

Depuis les 50 dernières années, les dilueurs à base de jaune d'œuf et de lait de vache sont les plus répandus pour la conservation des semences d'animaux d'élevage en frais ou en congeler (**Iritani & Nishikawa, 1961; O'Shea & Wales, 1966**). Cependant, le mécanisme par lequel le jaune d'œuf et le lait protègent les spermatozoïdes pendant la conservation en frais ou contre le cryodommage reste très peu connu.

Le jaune d'œuf est généralement très concentré dans le dilueur (20% v/v) ce qui a poussé plusieurs études à identifier son composant le plus actif qui serait responsable de l'effet protecteur (**Foulkes, 1977; Watson, 1981**). Il en est ressortit que la lipoprotéine de basse densité (*low-density lipoprotein* « LDL ») était le composant du jaune d'œuf montrant le meilleur effet protecteur de semence (**Pace & Graham, 1974; Watson, 1981**).

De plus, certaines études ont également montré que le LDL seul était largement responsable de la résistance des spermatozoïdes bovins au choc du froid ainsi que, l'amélioration de la motilité spermatique post dégel (**Moussa et al , 2002; Amirat et al , 2004**).

La majorité des protéines du lait sont des caséines organisées en micelles (80 %) qui seraient responsables de l'effet protecteur de la semence. Selon certains auteurs, les micelles de caséines extraites du lait permettent de conserver à 4°C la semence d'étalon (**Batellier et al , 1997**), de bouc (**Leboeuf et al , 2003**), de bélier (**O'Shea & Wales, 1966**) ainsi que la semence de taureau en frais (**O'Shea & Wales, 1966**) et en congelée en présence de glycérol (**Choong & Wales, 1963**).

4.1. Qualités des milieux de dilution

Les milieux de dilution doivent répondre à un certain nombre de conditions : Leur *pression osmotique* doit être isotonique avec le sperme pour l'espèce en cause et être capable de la maintenir pendant la durée de stockage. Ils doivent renfermer des substances colloïdales (jaune d'œuf, lipoprotéines, lécithines) susceptibles de protéger les spermatozoïdes. Les *substances tampons* permettent de maintenir un pH favorable aux spermatozoïdes (6.2 à 6.8). Leur présence est plus importante pour le sperme de taureau et de bélier que celui d'étalon et de verrat étant donné la concentration élevée en spermatozoïdes et donc la glyco-génolyse élevée du sperme de ces deux espèces qui est responsable d'une diminution rapide du pH. Les *substances nutritives* sont sensées favoriser le métabolisme, la vitalité et la longévité des spermatozoïdes. Le milieu de dilution doit être dépourvu d'*agents infectieux* car ils sont préjudiciables à la survie des spermatozoïdes, à la fécondation et au développement de l'embryon. Ce faisant, les spermatozoïdes se trouveront dans les meilleures conditions pour remplir leurs 4 fonctions préalables à la fécondation : a. activité métabolique productrice d'énergie, b. mobilité pour progresser dans les voies génitales femelles, c. enzymes de protection sur l'acrosome pour en faciliter la pénétration dans l'ovocyte, d. présence de protéines sur la membrane plasmique pour assurer leur survie optimale dans le tractus génital femelle et leur fixation sur la pellucide de l'ovocyte ,(Hanzan ,2008).

3.4.2. .Nature des milieux de dilution

Il existe quelque soit l'espèce animale une grande variété de dilueurs. Ils se différencient par la nature voire la concentration d'utilisation de leurs composants. On peut ainsi distinguer les dilueurs à base de jaune d'œuf phosphaté (Milieu de Lardy et Philips) ou citrate (Milieu de Salisbury), à bases de sucres (glucose, fructose : milieux de Kampschmidt, de Chominat, de Dimitropoulos, de Foote), à base de glyco-colle et de glycérol (milieu de Roy), de CO₂ (milieu de Van Demark ou IVT : Illinois Variable Temperature) ou et plus classiquement maintenant à base de lait dont certains sont commercialisés (Laiciphos IMT). Le *lait* peut être considéré comme un constituant de base apportant aux spermatozoïdes phosphates, citrates et sucres. Son pH est voisin de celui du sperme. Il est simple à préparer et peu cher. Le plus utilisé est préparé à partir de poudre de lait écrémé de vache additionné de cholestérol ou de lécithine, de sels, de glucose, d'acides aminés (glyco-colle, tryptophane, tyrosine) et d'antibiotiques (Laiciphos : IMV). Le *jaune d'œuf* est habituellement utilisé des concentrations comprises chez le taureau entre 5 et 15 %. Il protège le sperme grâce aux lécithines qu'il renferme de l'effet néfaste des brusques variations de température. Source de nutriments, il agit aussi favorablement vis à vis des variations de pH et de pression osmotique.

Les *antibiotiques* s'opposent au développement des micro-organismes. Classiquement, la pénicilline et la streptomycine sont employées à la dose respectivement de 1000 UI et d'un mg par ml de dilueur. On se souviendra que certains antibiotiques peuvent être toxiques pour le spermatozoïde. Ainsi en est-il de l'oxytétracycline à la dose de 500 mcg/ml, de l'achlorotétracycline à la dose de 50 mcg/ml. Dans l'espèce équine, la ticarcilline, l'amikacine, la polymixine et l'agentamycine ont également été recommandées. L'emploi du *glycérol* (agent cryoprotecteur) n'est requis que si le sperme est destiné à être congelé. Le glycérol fixe une partie de l'eau du dilueur et ce faisant abaisse le point de congélation du milieu, diminue la quantité de glace à la congélation et à la décongélation et diminue la taille des cristaux. Il exerce par ailleurs un effet protecteur sur les membranes cellulaires et limite l'augmentation de la pression osmotique en réduisant la quantité d'eau qui se transforme en glace.

3.4.3. Le taux de dilution

Pour le *taureau*, son calcul est basé sur l'obtention de doses d'insémination renfermant une concentration en zootechniquement acceptable soit 10 à 12 millions de spermatozoïdes par paille. Estimant à 40 % les pertes aux processus de congélation-décongélation, il faut donc obtenir au terme de la dilution une concentration moyenne de 20 millions de spermatozoïdes par paille de 0.25 ml. Cette valeur peut être revue à la baisse ou à la hausse en fonction de la qualité du sperme récolté. Soit la récolte de 10 ml de sperme renfermant 1 milliard de spermatozoïdes par ml. L'objectif étant d'avoir 20 millions de spermatozoïdes par paille (0.25 ml, 2 mm de diamètre) soit 80 millions de spermatozoïdes par ml, le coefficient de dilution sera de 1 milliard / 80 millions soit 12.5. Pour 10 ml de sperme, le volume final sera donc de 125 ml soit l'utilisation de 115 ml de dilueur (**Hanzan ,2008**).

4. Conservation et conditionnement

4.1. Conservation à court terme

L'utilisation directe du sperme dilué du bouc suppose une conservation à une température voisine de 5°C. Cependant, pour éviter les chocs thermiques, cette température doit être atteinte progressivement (rythme moyen de refroidissement de 0,5°C par minute entre 37 et 22°C et de 1°C par minute entre 22 et 5°C). Bien diluée et convenablement refroidie, la semence peut conserver son pouvoir de fécondation pendant 2 à 3 jours (**Brice et al, 2007**).

4.2. Conservation à long terme

La congélation requiert l'utilisation d'agents cryoprotecteurs. Classiquement, le glycérol est utilisé pour congeler le sperme. Il n'est pas inutile de préciser qu'étant donné les effets délétères potentiels des agents cryoprotecteurs sur le spermatozoïde, ils doivent être utilisés à une dilution optimale.

4.2.1. Phase de refroidissement

Le sperme est ajouté à la fraction A en deux temps. Dans un premier temps on mélange une quantité égale de sperme et de dilueur A. Ce mélange est après 2 à 3 minutes ajouté au reste du dilueur A. Ce milieu prédilué est alors amené progressivement à la température de 4°C. Une fois cette température atteinte, le dilueur B est ajouté au dilueur A en 4 étapes de 15 minutes. Il est important en effet de laisser au glycérol le temps de pénétrer dans les spermatozoïdes, ce processus étant d'autant plus long qu'il s'effectue à basse température. L'équilibration prend donc deux heures environ et la dilution finale de glycérol sera de 7% (**HANZEN, 2006**).

Cette descente de température a pour but de réduire les dépenses métaboliques et de prolonger la vie des spermatozoïdes (**Gadea , 2003**).

Le dilueur Glucose–citrate–jaune d'œuf est l'un des premiers à avoir été testé avec succès sur de la semence de bélier depuis 1960 (**Salamon et Maxwell, 2000**). Plus récemment, les dilueurs de conservation de la semence en frais sont à base de Tris : Tris –glucose –jaune d'œuf et Tris- citrate fructose – jaune d'œuf (**Salamon et Maxwell ,2000**).

En général la semence fraîche du bouc doit être inséminée dans les 8h suivant la collecte afin d'obtenir le taux de gestation optimal (**Maxwell et Watson, 1996 ; Salamon et Maxwell,2000**).

4.2.2. Phase de conditionnement

Une fois refroidi, le sperme sera conditionné le plus souvent en paillettes ou en pellets de 0,25 ml de volume. 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 (**Salamon et al, 2000**). Il convient de noter que ce type de congélation n'altère en rien le caractère pathogène de germes tels que *Brucella abortus*, *Campylobacter foetus*, *Actinomyces pyogenes* ou *Listeria monocytogenes*. Le transport des paillettes se fera dans des containers cryogéniques ou cuves d'azote dont il existe différents modèles de capacité et de propriétés thermiques différentes. Une vérification

régulière du niveau d'azote de ces cuves s'impose. Par ailleurs, la température doit toujours y être inférieure à -120°C . Il est indispensable pour ce faire d'y maintenir un niveau minimal de 5 cm d'azote liquide (Salamon et al, 2000). L'évaporation sera fonction de la fréquence d'ouverture de la cuve et du temps nécessaire au choix d'une paillette (5 à 8 secondes).



Figure 6 :Conditionnement de la semence.

4.3.Cryoconservation de la semence

La cryoconservation se définit comme l'utilisation de très basses températures pour conserver à long terme des cellules ou tissus, tout en maintenant intact leur structure et leurs fonctions (Mazur, 1984). Cette dernière partie de la définition est la plus difficile à maîtriser puisque les cellules et tissus ne sont pas naturellement programmés pour résister à la congélation et la majorité des cellules non protégées subissent d'importants dommages à basse température. De plus, les cellules spermatiques ne possédant aucun système de réparation subissent des dommages irréversibles rendant la semence non fonctionnelle.

Il devient, donc, indispensable de maîtriser les modifications biologiques, physiologiques et physiques s'exerçant sur les cellules et leur environnement au moment de la cryoconservation afin d'apporter aux spermatozoïdes des composants pouvant leur permettre de résister à ces modifications délétères.

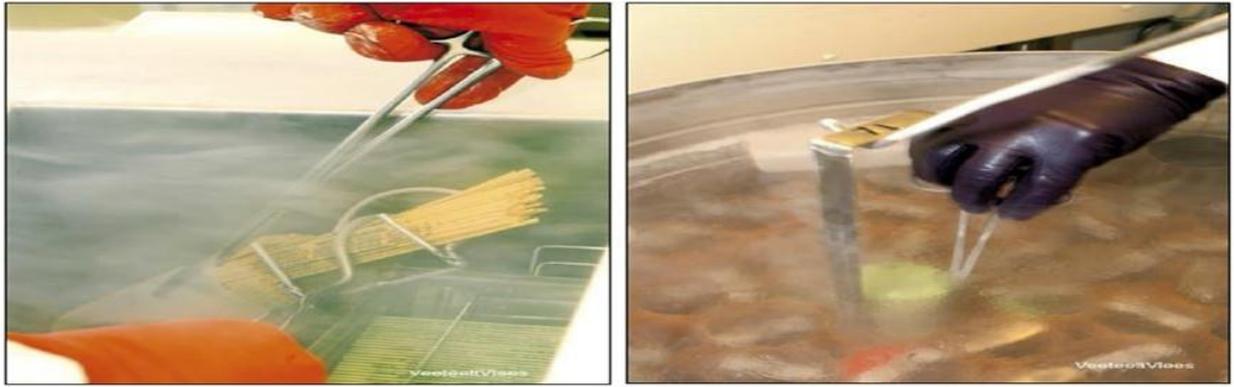


Figure 7 : congélation et stockage de paillettes (Internet).

4.3.1. Les agents cryoprotecteurs

Un cryoprotecteur est inclus dans un milieu de cryoconservation pour minimiser les contraintes physiques et chimiques résultant du refroidissement, de la congélation et de la décongélation des spermatozoïdes. Les cryoprotecteurs sont classés comme pénétrants ou non pénétrants. Un cryoprotecteur pénétrant est perméable à la membrane et agit au niveau intra- et extra-cellulaire. Les cryoprotecteurs pénétrants sont des solutés, qui provoquent la déshydratation des spermatozoïdes en raison du flux d'eau entraîné par l'osmose, qui varie selon le composé. Après de courtes périodes de temps, le cryoprotecteur et l'eau s'équilibrent et donnent des concentrations intra et extracellulaires similaires (**Amann, 1999**). Comme le spermatozoïde a maintenant moins d'eau intracellulaire, le point de congélation de la cellule est diminué et il y aura moins de formation de glace intracellulaire, ce qui est bénéfique, car la glace intracellulaire entraîne la mort de la cellule, et donc une réduction de la fertilité de l'échantillon de sperme. Les cryoprotecteurs pénétrants provoquent également un réarrangement des lipides et des protéines membranaires, ce qui se traduit par une plus grande fluidité de la membrane, une plus grande déshydratation à basse température et donc une plus grande capacité à survivre à la cryoconservation (**Holt, 2000**). En outre, les cryoprotecteurs pénétrants sont des solvants qui dissolvent les sucres et les sels dans le milieu de cryoconservation. Un cryoprotecteur non pénétrant ne peut pas traverser la membrane plasmique du sperme et n'agit donc que de manière extracellulaire (**Amann, 1999**). Par conséquent, un cryoprotecteur non pénétrant peut modifier la membrane plasmique d'une cellule, ou agir comme un soluté et abaisser la température de congélation du milieu (**Amann, 1999**).

De nombreux cryoprotecteurs perméables à la membrane (glycérine, diméthyl sulfoxyde, éthylène glycol, et propylène glycol), et leurs combinaisons, ont été testés avec du sperme de

cerf (**Ritar et al , 1990a,b ; Tuli et Holtz, 1994 ; Singh et al., 1995 ; Kundu et al , 2000 ; Leboeuf et al , 2000**), mais le cryoprotecteur pénétrant le plus fréquemment utilisé est le glycérol. L'ajout de glycérol peut être effectué par une méthode en 1, 2 ou 3 étapes, à 37 °C ou 5 °C (**Corteel, 1974 ; Salamon et Ritar, 1982 ; Tuli et Holtz, 1994 ; Leboeuf et al ,2000**).

4.4. La conservation a l'état liquide

Le sperme du bouc peut être conservé à des températures allant de 2 à 15°C, le plus souvent à 4°C. Actuellement, pour la préservation de la semence à l'état liquide à 4°C, les milieux à base de lait écrémé sont les plus utilisées (**Leboeuf et al, 2003**). Une manière de conserver la semence de taureau, bouc, bélier ou cheval en frais est de descendre progressivement sa température à 5°C après sa dilution (**Katila, 1997; Leboeuf et al , 1998; Verberckmoes et al , 2005; O'Hara et al , 2010**). Cette descente en température a pour but de réduire les dépenses métaboliques et de prolonger la durée de vie des spermatozoïdes (**Gadea, 2003**).

III.Synchronisation des chaleurs

La synchronisation des chaleurs est une démarche très importante en reproduction caprine, essentiellement en vue d'effectuer une insémination artificielle. Elle permet non seulement de gagner du temps mais surtout de regrouper les apparitions de l'œstrus chez les femelles, ce qui facilite la gestion de l'élevage et la réalisation de l'insémination artificielle.

Le traitement hormonal permet quelle que soit la saison de déclencher l'œstrus et l'ovulation ainsi que le regroupement des mises bas. Les méthodes de contrôle de l'œstrus et de l'ovulation peuvent permettre de choisir la période d'IA et d'inséminer les femelles une seule fois à un moment déterminé, tout en préservant un niveau de fertilité satisfaisant (**Fatet, et al 2008**). La détection de l'œstrus est généralement appuyée sur le critère de réceptivité sexuelle de la femelle (acceptation) subissant une monte par le mâle. C'est, en fait, l'immobilisation posturale de la femelle qui va permettre la saillie et donc le dépôt de la semence par le mâle dans les voies femelles (**Baril et al , 1993**).

1.Méthode de synchronisation des chaleurs

En élevage caprin, la principale méthode d'induction- synchronisation de l'œstrus est le traitement hormonal. L'association entre un progestatif, (acétate de flugestone, souvent délivré par une éponge vaginale), un analogue de prostaglandine F2a et laPMSG (actuellement appelée eCG pour "*equine Chorionic Gonadotrophin* "), reste le moyen le plus efficace pour atteindre ces objectifs (**Chemineau,1999**).

Le traitement consiste à mimer certains événements endocriniens qui contrôlent le cycle sexuel, afin d'induire l'œstrus et l'ovulation à un moment prédéterminé (**Leboeuf,1998**). Ainsi, la mise en place d'une éponge vaginale imprégnée d'un analogue de la progestérone (FGA : acétate de progestone) simule la phase lutéale du cycle sexuel ,durant laquelle la forte concentration de progestérone inhibe la sécrétion pulsatile de:gonadolibérine par l'hypothalamus, bloquant ainsi l'ovulation jusqu'à la lutéolyse suivante .

L'administration de PMSG (Pregnant Mare Serum Gonadotropin) qui présente une activité FSH (Follicle Stimulating hormone) et LH (Luteinizing hormone) 48 heures avant le retrait de l'éponge vaginale, permet de stimuler la croissance folliculaire. L'injection au même moment d'un analogue de prostaglandine F2a (cloprosténol) provoque la lutéolyse chez les femelles qui présentent un corps jaune encore fonctionnel en fin de traitement. Enfin, le retrait de l'éponge la durée du traitement chez les caprins a donc été

réduite à 11 ± 1 j, entraînant une chute de la concentration de FGA dans la circulation sanguine, provoque l'arrêt de l'inhibition de l'axe hypothalamo-hypophysaire, puis l'apparition des événements endocriniens induisant l'œstrus et l'ovulation.

Cependant, selon **Chemineau et al,1999** l'utilisation répétée de eCG sur les mêmes chèvres diminue son efficacité. Cela est dû à l'apparition d'anticorps anti- eCG. En attendant des améliorations ou la mise en place d'autres protocoles, l'insémination des seules femelles qui ont été détectées en œstrus à 30 heures après retrait de l'éponge est recommandée. D'autres méthodes peuvent être employées pour induire l'œstrus. On peut citer:

- L'effet du mâle sur l'induction de la cyclicité chez des femelles en anœstrus.

L'introduction des mâles dans un groupe de femelles après une séparation d'au moins 3 semaines permet de provoquer la rupture de l'anœstrus et synchroniser la reproduction (**Délgadillo,1997**). La mise en contact des mâles avec des femelles en œstrus avant leur introduction dans un groupe de femelles en anœstrus, augmente la réponse œstrienne et ovulatoire.

Baril et al, 1993 rapportent que la quasi-totalité des chèvres répondent au traitement de synchronisation des chaleurs, quel que soit le moment de l'année. Entre 24 et 72 heures après le retrait de l'éponge, 8,1 % des femelles montrent des signes de chaleurs et acceptent le chevauchement du mâle. En saison sexuelle, sans eCG, plus de 70 % des femelles sont synchronisées avec un délai d'apparition de l'œstrus plus tardif et plus variable (**Baril , 1993**).

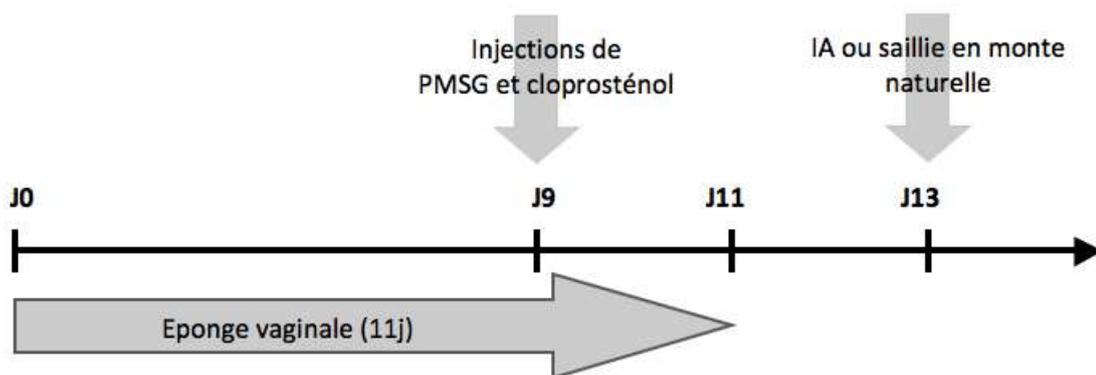


Figure 8: Schéma représentant le protocole de synchronisation des chaleurs chez la chèvre.

IV. Insémination artificielle

1. Définition

L'insémination artificielle (I.A.) est le dépôt des spermatozoïdes dans les voies génitales femelles par des techniques appropriées sans qu'il y ait accouplement. Elle permet une utilisation rationnelle dans l'espace et dans le temps des hautes capacités génétiques d'un mâle par le biais de la récolte et de la conservation de son sperme.

L'IA qui est la « biotechnologie » de reproduction la plus largement utilisée dans le monde, est considérée comme l'un des outils de la diffusion du matériel génétique performant (**Haskouri , 2001**) ; elle consiste à ce titre un outil de base du développement de l'élevage (**Derivaux et Ectors, 1989**).

1.1. Historique

L'IA a été utilisée au 14^{ème} siècle chez la jument par les Arabes et ce, grâce à **Abou Bakr Ennaciri** , mais c'est seulement à la fin du 18^{ème} siècle que les premières inséminations des mammifères ont été rapportées. La création du vagin artificiel est l'évènement qui a permis le véritable essor de la méthode et son application pratique en élevage. Néanmoins, la conservation du sperme à la température ambiante ne permettait pas le testage des géniteurs. C'est ainsi que la congélation a facilité d'une part le testage des reproducteurs, et d'autre part la réalisation des banques de semences de qualité et les échanges de matériels génétiques entre les centres nationaux et internationaux (**Haskouri, 2002**).

2. Avantages et inconvénients

2.1. Avantages

L'IA a plusieurs avantages et ne peut être appliquée sans discernement, car son efficacité suppose un plan de génétique appliquée (**Derivaux et Ectors, 1989**).

2.1.1. Avantages sanitaires

L'intérêt sanitaire se traduit par la prévention de la propagation de maladies contagieuses et/ou vénériennes (grâce au non contact physique direct entre la femelle et le géniteur, et par l'utilisation de matériel stérile et à usage unique), et le fait d'éviter la transmission des maladies génétiques liées à l'utilisation prolongée d'un reproducteur dans la même ferme. Cependant, il existe certains agents infectieux qui peuvent être présents dans la semence et transmis notamment le virus aphteux ; le virus bovine pestique ; le virus de la fièvre

catarrhale du mouton ; le virus de l'IBR ; *Brucella abortus* et *Campylobacter*.... Toutefois le contrôle de maladies grâce aux normes sanitaires strictes exigées au niveau des centres producteurs de semences permet de réduire considérablement le risque de transmission de ces agents par voie "mâle" (Haskouri , 2001).

2.1.2. Avantage d'ordre génétique

Cette technique est la seule qui a permis à la fois l'exploitation rationnelle et intensive et une plus large diffusion de la semence des meilleurs géniteurs testés pour leurs potentialités zootechniques. Elle permet également la diffusion très rapide dans le temps et dans l'espace du progrès génétique (Barbat et al , 2000).

2. 1.3. Avantage d'ordre économique

L'achat et l'entretien d'un bouc demande la mobilisation d'un capital assez important et entretien coûteux. A l'opposé, l'IA entraîne une augmentation de la productivité du bouc en même temps qu'il rend possible son remplacement par une chèvre. Le bilan des avantages et des inconvénients possibles de l'IA est pour l'instant nettement positif et la balance demeure ainsi pour longtemps.

2.2. Inconvénients

Bien que cette technique soit, sans aucun doute, un outil puissant pour la gestion du patrimoine génétique, son efficacité est contrebalancée par deux (2) types de contraintes venant du faible nombre de reproducteurs nécessaires à chaque génération (puisque chacun d'entre eux possède un vaste pouvoir de diffusion), ainsi qu'au changement dans l'expression de certains caractères, notamment de reproduction.

L'utilisation d'un nombre limité de reproducteurs peut conduire aux situations suivantes :

Une diminution de la variabilité génétique. Ce risque, qui est le plus fréquent, doit être gardé présent à l'esprit lorsqu'un programme de sélection est mis en route, et les reproducteurs de la première génération doivent venir d'origines les plus diverses possibles ; une diffusion de défauts héréditaires ou d'une maladie non contrôlée (ou inconnue) est toujours possible. En effet, une anomalie chromosomique peut être rapidement et largement diffusée dans une population par l'IA ; un accroissement du taux de consanguinité affectant les caractères maternels, qui sont particulièrement sensibles, est à redouter.

Paradoxalement, l'utilisation de la synchronisation des œstrus et de l'IA perturbe le fonctionnement des schémas de sélection sur les aptitudes de reproduction.

En effet, la prolificité naturelle et induite (de femelles mettant bas après synchronisation de l'oestrus) n'est pas contrôlée par les mêmes gènes. Il est donc nécessaire de modifier les enregistrements à réaliser en ferme, pour pouvoir estimer la valeur génétique de la prolificité naturelle.

Il y a certains dangers qui tiennent à un mauvais choix du géniteur, une perte possible de gènes (c'est le cas de la sélection du caractère de haute production laitière ou de viande qui a été obtenu au détriment de la rusticité, de la longévité, de la fécondité...) et la consanguinité.

3. TECHNIQUE DE L'INSEMINATION ARTIFICIELLE

3.1. Moment de l'IA

L'insémination Artificielle doit être pratiquée en tenant compte du fait que la durée de vie des spermatozoïdes n'excède pas 24 heures, et que l'ovule est fécondable dans les heures qui suivent sa libération.

D'après **PAREZ (1983)**, le moment de l'IA est fonction de paramètres suivants :

- le moment de l'ovulation (14h après la fin des chaleurs) ;
- la durée de fécondabilité de l'ovule (5h environ) ;
- le temps de remontée des spermatozoïdes vers les voies génitales (2-8h), et la durée de fécondabilité des spermatozoïdes (20h environ).

La mise en concordance de ces paramètres montre qu'il peut y avoir possibilité de fécondation avec une IA réalisée entre 12h et 18h après le début des chaleurs. Etant donné que l'IA doit être pratiquée à un moment assez proche de l'ovulation ; si l'on admet que la durée de l'oestrus est de 12-24h, que l'ovulation a lieu 10-12h après la fin de l'oestrus, et que les spermatozoïdes doivent séjourner pendant environ 6h dans les voies génitales femelles (phénomène de capacitation), le meilleur moment de l'IA est la deuxième moitié de l'oestrus, c'est-à-dire dans les 12-24h qui suivent le début des chaleurs.

3.2. Procédé d'IA

3.2.1. Particularités anatomo-physiologiques chez la chèvre

L'insémination artificielle présente chez les petits ruminants quelques particularités anatomiques. Chez la brebis, l'endocol dessine de nombreux replis qui rendent le canal cervical très sinueux et empêche comme chez les bovins une insémination intra-utérine. Chez

la chèvre par contre, le col s'entrouvrant légèrement pendant les chaleurs, il est possible de le franchir dans 10 à 30 % des cas (Hanzen , 2008). L'insémination par laparoscopie constitue une méthode alternative mais elle est peu employée.

3.2.2. Réalisation pratique de l'insémination

Les semences sont conditionnées en paillettes de 0,2 ml contenant 100 millions de spermatozoïdes. Une seule insémination est réalisée 43 heures environ après le retrait de l'éponge pour les chèvres alpines et 45 heures plus tard pour les chèvres Saanen. Plus rarement, l'insémination est effectuée sur œstrus observé 24 heures après son début. Une fois sortie du réservoir d'azote liquide, la paillette congelée est plongée dans de l'eau à 37°C pendant 15 secondes puis essuyée et introduite dans le pistolet d'insémination préalablement réchauffé. L'extrémité de la paillette est coupée et recouverte d'une gaine protectrice puis bloquée avec un anneau.

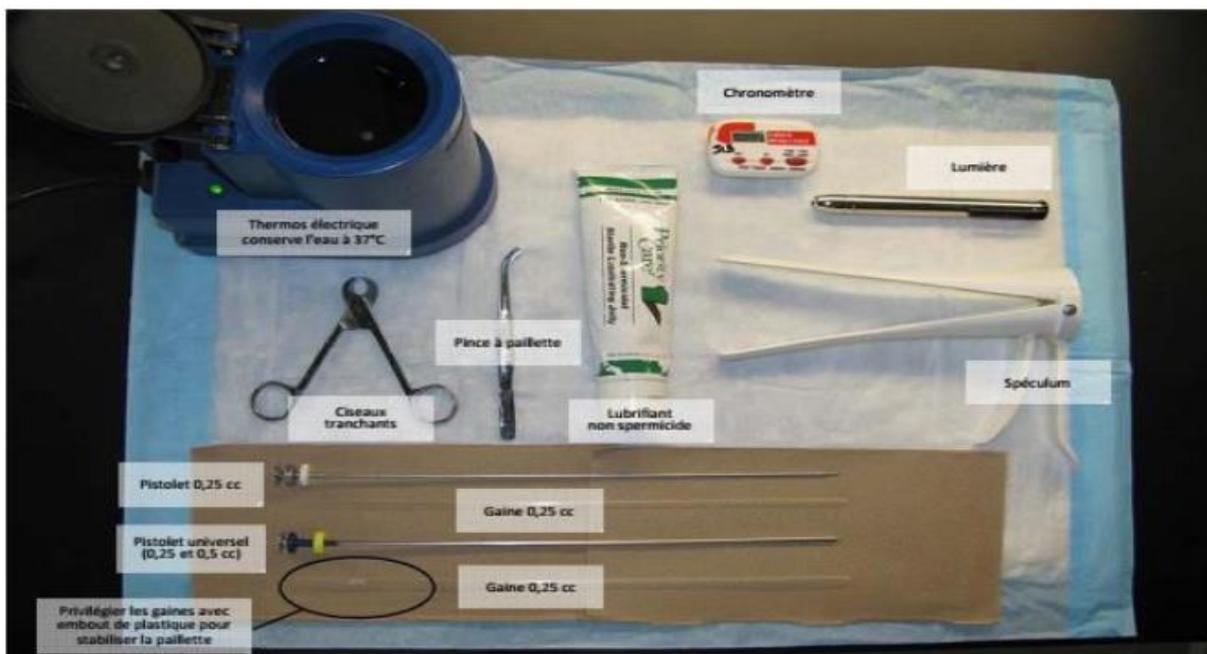


Figure 9 :Matériel d'insemination artificielle .

3.3. Lieu de dépôt de la semence

L'arrière-train de l'animal est soulevé et la vulve au besoin nettoyée. Le spéculum est introduit et le col de couleur rose ou rouge repéré sur le plancher du vagin. L'extrémité du pistolet est guidée vers le col dans lequel il est introduit le plus loin possible par des mouvements de rotation. Le sperme est expulsé et le pistolet retiré. Le spéculum est désinfecté entre les animaux. La réussite de l'insémination tient davantage au choix du

moment par rapport à l'ovulation qu'à une manipulation particulière du col (**Bizimungu, 1991**).

Si l'IA a réussi, il faut passer à l'étape du diagnostic de gestation quelque temps plus tard. Ce diagnostic a pour importance de : savoir si la femelle est gestante pour lui apporter les soins nécessaires au bon déroulement de la gestation ; savoir si la femelle n'est pas gestante en vue de la mettre encore en reproduction ; diagnostiquer très tôt certaines pathologies liées à la gestation ; N'étant pas effectués au même stade de gestation, les différents tests n'ont pas la même interprétation. Le test d'inhibition de rosette est un test de réussite de la fécondation tandis que l'observation de la mise bas signifie qu'il y a eu réussite de la fécondation, de la nidification, de la survie du fœtus. Multiplier les tests à différents moments de la gestation permet d'identifier les causes d'échec de l'insémination (résorption embryonnaire précoce ou avortement. . .) (**Bodin et al , 1999**).



Figure 10 :Insémination artificielle chez la chèvre (Internet).

4. Paramètres influençant le taux de réussite de l'insémination artificielle

Puisque les deux individus du couple interviennent dans les différentes étapes de la reproduction ; la réussite de l'insémination est dépendante de deux caractères distincts : la fertilité de la femelle d'une part et la fécondance du mâle d'autre part. Les facteurs de variation de la réussite de l'insémination peuvent être spécifiques du mâle (âge, qualité de la semence. . .), de la femelle (âge, carrière. . .) ou communs aux deux sexes (année, saison). De plus, si l'insémination est artificielle, il s'ajoute les facteurs liés à ce type d'insémination (inséminateur, mode de préparation des paillettes. . .).

4.1. Variables d'étude

Les variables d'étude utilisées pour analyser la réussite de l'IA sont nombreuses et fonction de la précocité du diagnostic de gestation et du système de reproduction (IA au lot, une ou plusieurs IA. . .).

Elles peuvent être une mesure directe de la réussite de l'IA (variable binaire : succès/échec) et, en fonction du diagnostic de gestation utilisé, correspondre à l'événement de la mise bas (principalement utilisée pour les petits ruminants (Anel *et al* , 2005 ; Bunge *et al* , 1990 ; Forgaty *et al* , 1985), de la gestation par cycle (souvent utilisée en équine (Colenbrander *et al* , 2003) ou du non-retour en chaleur (souvent utilisée chez les bovins (Nadarajah *et al* , 1988 ; Ranberg *et al* , 2003 ; Weigel *et al* , 2000)).

4.2. Facteurs intrinsèques liés au mâle

Dans le cadre de l'insémination artificielle, un mâle insémine de nombreuses femelles. La fécondance des mâles constitue donc un point critique dans la réussite d'un schéma de sélection (Colenbrander *et al* , 2003). On peut rechercher une évaluation de la fécondance mâle au niveau de l'éjaculat ou de l'individu. Au niveau de l'éjaculat, de nombreuses études ont recherché les caractéristiques du sperme qui pouvaient être liées à son pouvoir fécondant (qualités de la semence). Trouver ces critères de qualité permettrait de prédire a priori le pouvoir fécondant d'un éjaculat et de le sélectionner pour fabriquer des doses d'insémination. A l'inverse, connaître les caractéristiques de l'individu affectant la fécondance du sperme, fournirait des informations pour gérer les reproducteurs.

4.2.1 Qualité de la semence

Le processus de reproduction étant complexe, l'évaluation de la fécondance du sperme n'est pas aisée. Un bon éjaculat contient de nombreux spermatozoïdes aptes à effectuer la fécondation. Pour ce faire, ces spermatozoïdes sont capables de rejoindre rapidement le lieu de rencontre des gamètes, en outre ils possèdent une membrane cytoplasmique et un acrosome intact pour la reconnaissance et la pénétration de l'ovocyte. Aussi ils disposent d'un matériel nucléaire intact permettant la création de l'embryon.

4.2.2 Caractéristiques du mâle

Peu d'études ont analysé la liaison entre les caractéristiques du mâle et sa fécondance du fait de la faible part de variabilité de la réussite de l'insémination imputable au mâle

(Boichard et Manfredi , 1994) et par le manque de retour d'informations relatives à celui-ci en routine.

Averill et al. (2004) mettent en évidence une influence positive significative de l'âge des taureaux sur la réussite de l'IA. Néanmoins, il est possible que dans leurs études les jeunes taureaux aient été accouplés avec les femelles les moins fertiles. Bunge et al, (1990) notent que, sur des jeunes béliers entre 5 et 7 mois, la probabilité de réussite de l'insémination est plus faible chez des mâles issus de portée de jumeaux que chez des mâles issus de simple portée. Cette association pouvant être la conséquence d'un poids plus élevé des mâles issus de simple portée et donc d'une puberté plus précoce chez ces derniers.

4.3. Facteurs intrinsèques liés à la femelle

La majeure partie des études de la réussite de l'IA porte uniquement sur l'étude de la fertilité des femelles vraisemblablement parce que les événements reproducteurs de la femelle influencent plus la réussite de l'insémination que ceux du mâle (Foote , 2003).

4.3.1. Carrière de la femelle

Dans différentes espèces, il a été montré que la probabilité de réussite de l'insémination diminue avec la parité et/ou l'âge de la femelle (Anel et al , 2006 ; Grimard et al., 2006 ; Nadarajah et al, 1988 ; Stalhammar et al, 1994). La fertilité maximale des chèvres est située entre 2 et 4 ans d'âge, au plus de 5 ans la fertilité diminue progressivement (Bister J.L, 2006). Plusieurs explications de ce résultat ont été avancées dans la littérature. Cette tendance peut être liée à une diminution de la réponse des femelles à la synchronisation par production d'anticorps anti-PMSG résultante des synchronisations précédentes (Bodin et al, 1997), par la diminution de la qualité des gamètes femelles ou par un dérèglement de la phase lutéale chez les bovins (Garcia -Ispuerto, 2007).

L'intervalle de temps entre la mise bas précédente et l'insémination est également un facteur de variation important de la fertilité femelle dans différentes espèces car il correspond au temps nécessaire au repos de l'appareil génital femelle et à la reconstitution des réserves corporelles. Plus cet intervalle est long, plus la probabilité de réussite de l'insémination est élevée (Anel et al , 2006 ; Grimard et al , 2006).

3.2. Production laitière

De nombreux auteurs ont mis en évidence, principalement chez les bovins, une relation phénotypique négative entre la production laitière et la réussite de l'insémination

(Melendez et Pinedo , 2007). Cette corrélation peut être la combinaison entre la liaison génétique négative qui existe entre ces deux caractères (Anderson –Ranberg et al , 2005b ; Dematawewa et Berger , 1998 ; Gonzalez –Recio et Alenda , 2005 ; Kadarmideen et al, 2000) et un effet de balance énergétique moins bonne au moment de l'insémination pour les fortes productrices de lait (Grimard et al ,2006).

3.3. Poids, Note d'Etat Corporel (NEC)

La relation entre la condition corporelle de la femelle et sa fertilité a été principalement étudiée en élevage bovin. Les résultats concernant la relation entre l'indice de condition corporelle au moment de l'IA et la réussite de cette dernière sont variables en fonction des études.

Il n'existe pas de relation significative entre ces variables pour Grimard et al. (2006) et une relation positive pour Roche (2007). Cette relation peut être en partie expliquée par les corrélations génétiques positives existant entre l'indice de condition corporelle et la réussite de l'IA (Pryce et Harris , 2006).

En revanche, il existe un consensus sur la relation entre les variations de condition corporelle et la réussite de l'insémination. Il existe une relation négative significative entre la perte de poids depuis la mise bas précédente et la réussite de l'IA (Bulter , 1998 ; Roche , 2007).

4. Facteurs extrinsèques

4.1. Facteurs liés à l'insémination

La préparation et le déroulement de l'insémination sont des points critiques de la réussite de l'IA. Les spermatozoïdes vigoureux doivent être correctement inséminés au moment opportun. Il est possible de distinguer deux types de facteurs de variation : le mode de préparation des paillettes (dilueur, taux de dilution) et le déroulement de l'insémination en tant que tel (inséminateur, lieu de dépôts de la semence. . .).

4.2. La préparation des paillettes

La semence peut être conservée sous trois formes : congelée (-196°C), réfrigérée (5°C) ou fraîche (15°C). La semence congelée a l'avantage de pouvoir être conservée longtemps contrairement à la semence fraîche qui doit être rapidement mise en place (quelques heures). Néanmoins, le pouvoir fécondant du sperme s'en trouve affecté (Donovan et al., 2004 ;

Fernandez –Abella et al , 2003 ; Findlater et al , 1991) et le taux de réussite de l'IA intra-vaginale en semence congelée n'est pas satisfaisant (**Salamon et Maxwell , 2000**).

Ceci est lié à une diminution de la survie des spermatozoïdes dans l'utérus ou à une augmentation de la mortalité embryonnaire précoce (**Maxwell et Salamon , 1993**).

Le diluant utilisé pour la conservation des spermatozoïdes est variable en fonction de la température de conservation de la semence. Régulièrement de nouveaux essais de diluants et de mode de préparations de la semence sont effectués dans le but d'augmenter le temps de survie des spermatozoïdes ou leur pouvoir fécondant (**Cheng et al , 2004 ; D'alessandro et al , 2001 ; Gil et al , 2003a ; Gil et al , 2003b ; Gil et al , 2000**).

Plus que le taux de dilution de la semence, le nombre de spermatozoïdes mis en place est un facteur de variation de la réussite de l'insémination. **Fernandez –Abella et al. (2003)** montrent qu'à nombre de spermatozoïdes inséminés constant, il n'y a pas d'effet de la concentration et du volume de semence inséminée sur la probabilité de réussite de l'IA.

Enfin, le type de semence utilisée peut jouer un rôle sur sa conservation. **Guerin et al. (2003)** ont montré la possibilité d'utiliser du sperme épидидymaire, ce dernier ayant l'avantage d'avoir une longue durée de conservation à 4°C.

4.3. Déroulement de l'insémination

En semence fraîche, la durée de conservation du sperme étant courte, l'intervalle de temps entre la collecte et l'IA est un facteur de variation de la réussite de l'insémination. Idéalement, le dépôt de la semence doit être intra-utérine. La cathétérisation du col est aisée chez les bovins mais quasiment impossible chez les caprins, du fait de la conformation particulière du col de la chèvre (**Kaabi et al , 2006**). Plus le dépôt de la semence est profonde par cette voie, plus la probabilité de réussite de l'insémination augmente (**Salvador , 2005**). La technicité de l'inséminateur semble intervenir sur le lieu de dépôt, puisque l'effet inséminateur est significatif dans de nombreuses études (**Anel et al , 2005 ; Donovan et al , 2004 ; Garcia –Ispierto , 2007**) exceptée celle de **Salvador et al , (2005)** qui étudie l'effet inséminateur ajusté sur le lieu de dépôt de la semence. Outre la technicité de l'inséminateur, le matériel utilisé peut intervenir sur le lieu de dépôt, ainsi **Kaabi et al. (2006)** montrent que chez les ovins, un cathéter courbe pénètre plus loin dans le col qu'un cathéter droit.

4.4. Habileté de l'inséminateur

Pour toutes les espèces domestiques où l'insémination artificielle est pratiquée, il existe des différences significatives de fertilité entre inséminateurs. L'expérience de

l'inséminateur apparaît importante pour l'obtention d'un bon niveau de fertilité. La fertilité augmente avec le nombre de chèvres inséminées annuellement par agent. Cette source de variation du taux de réussite à l'I.A. ne doit pas être attribuée exclusivement à l'inséminateur car elle peut être associée à d'autres facteurs de variation de la fertilité tels que la race des chèvres et tous ceux concourant à l'effet élevage d'une même zone géographique (INRA, 1995).

4.5. Heure de retrait d'éponge

Chez les chèvres de race Alpine, le niveau de fertilité diffère selon l'heure du retrait de l'éponge ; il est significativement plus élevé pour un retrait de l'éponge avant 14 heures, ce qui entraîne une mise en place de la semence tôt le matin. Cette situation n'est pas observée chez les chèvres de race Saanen (INRA, 1995).

4.6. Année et saison

L'année et la saison sont des facteurs de variation de la fertilité des femelles et de la fécondance des mâles. Lorsque l'insémination se déroule en semence fraîche, l'année et la saison sont systématiquement identiques pour le mâle et la femelle d'un couple. Dans ce cas, il est difficile d'identifier lequel des deux caractères est influencé par ces facteurs ; excepté dans le cadre de dispositif expérimental contrôlant l'effet de la saison sur l'un ou l'autre sexe (en mimant le photopériodisme par exemple).

L'année est souvent l'un des facteurs de variation majeur de la réussite de l'insémination.

En élevage bovin laitier, on note une tendance à la diminution de la réussite de l'IA avec les années. Ceci est vraisemblablement lié à la corrélation génétique négative entre fertilité des femelles et production laitière (Gonzalez –Recio *et al* , 2005 ; Mackey *et al* , 2007). Il a été mis en évidence une saisonnalité de la réussite de l'insémination dans de nombreuses espèces. Chez les bovins, la probabilité de réussite de l'IA est plus élevée en été (jours longs) (Anderson –Ranberg *et al* , 2005A ; Stalhammar *et al* , 1994) dans les pays nord européens (Suède, Norvège) alors que celle-ci est plus faible en période chaude au sud de l'Europe (Espagne) (Garcia –Isperto , 2007). La saisonnalité de la reproduction de certains petits ruminants est bien connue et il est possible de simuler les jours courts chez les femelles par pose d'un implant de mélatonine, ce qui augmente le taux de réussite de l'insémination chez les petits ruminants (Abecia *et al* , 2007 ; Chemineau *et al* , 1996). Colas *et al*. (1985), dans une étude sur la relation entre photopériodisme et fécondance du

sperme, mettent en évidence une amélioration de la fécondance des béliers en lumière décroissante par rapport à des béliers en lumière croissante.

4.6. Elevage et le système d'élevage

L'effet élevage est l'un des facteurs de variation importants de la réussite de l'IA pour différentes espèces. Plus que les différences de localisation géographique entre élevages, ce facteur traduit les différences de conduite d'élevage qui existent entre troupeaux. Cette hypothèse va dans le sens des résultats de **Garcia –Isperto (2007)** pour lequel l'effet élevage n'était pas significatif dans une étude où tous les élevages étaient homogènes du point de vue de la gestion de leurs animaux.

5. Paramètres génétiques de la réussite de l'insémination

La plupart des études a estimé les paramètres génétiques de la fertilité femelle et seulement quelques études ont réalisé une estimation de la fécondance des mâles ou une estimation conjointe des deux caractères. Comme nous l'avons décrit précédemment, il existe de nombreuses variables d'études de la réussite de l'insémination.

Celles-ci n'ont pas toute la même interprétation. Elles peuvent être des variables continues (intervalle entre mise bas, intervalle entre la première IA et l'IA fécondante. . .) ou binaires (mise bas sur IA, gestation sur IA. . .). Généralement, les valeurs d'héritabilité et de répétabilité obtenues sur les phénotypes binaires de la réussite de l'IA sont plus faibles que celles obtenues sur des phénotypes continus. L'héritabilité de la fertilité femelle est généralement inférieure à 10%. Celle de la fécondance mâle est, généralement, plus faible et inférieure à 5% (**Piles et al , 2005 ; Ranberg et al , 2003 ; Varona et Noguera , 2001**).

Néanmoins, ces faibles valeurs d'héritabilité ne s'opposent pas à la mise en place d'une sélection sur ces caractères car il existe une variabilité génétique bien qu'elle soit masquée par une valeur génétique résiduelle très forte (**Boichard et Manfredi , 1994**). Les résultats positifs obtenus sur des expériences de sélection divergente chez les petits ruminants vont dans ce sens (**Al-Shorepy et Notter , 1997**).

Il existe une grande variabilité dans l'estimation de la corrélation génétique entre fécondance mâle et fertilité femelle. Cette corrélation varie de -0,5 chez le porc (**Varona et Noguera , 2001**) à +0,7 chez le lapin (**Piles et al , 2005**). Ces différences sont probablement dues à la difficulté d'estimation de cette corrélation avec de faibles valeurs d'héritabilités ; la corrélation s'accompagnant d'une très faible précision.

Il a été mis en évidence dans différentes études une corrélation génétique négative chez les bovins entre la fertilité femelle et la production de lait (**Anderson –Ranberg et al , 2005b ; Boichard et al , 2002 ; Dematawewa et Berger , 1998 ; Gonzalez –Recio et al , 2006 ; Kadarmideen et al , 2000 ; Wall et al , 2003**).

Synthèse des articles scientifiques

En raison des particularités du sperme caprin , cette étude traite les effets du plasma séminal, les milieux de cryoconservation, les cryoprotecteurs, la dilution , la vitesse de refroidissement, et le taux de décongélation du sperme spécifique à l'espèce caprine.

1. Traitement général du sperme

1.1. Plasma séminal

Les diluants de cryoconservation les plus utilisés pour le sperme de caprin, contiennent soit du jaune d'œuf, soit du lait séché écrémé. Cependant, la dilution de la semence de bouc dans les diluants contenant du jaune d'œuf ou du lait peuvent être nocifs aux spermatozoïdes. Les interactions néfastes entre le plasma séminal et le jaune d'œuf ont été documentés pour la première fois par **Roy (1957)** qui a observé que les spermatozoïdes conservaient leur motilité dans les diluants du jaune d'oeuf si le plasma a été retiré, mais si du sperme pur a été ajouté le milieu du jaune d'œuf, le jaune d'œuf coagulait et le spermatozoïdes mouraient . Il a également été déterminé que le jaune d'œuf coagulait par une enzyme d'origine bulboburétrale, ainsi nommée l'enzyme de coagulation du jaune d'œuf (EYCE).

Les interaction néfastes ont été observées avec le lait, par **Nunes et al. (1982)** qui ont identifié une protéine (SBUIII) sécrétée par la glande bulboburétrale du bouc , qui a diminué la survie du sperme de bouc refroidi ou congelé dilué dans un milieu à base de lait . Elle a également induit la réaction acrosomique et la mort cellulaire ultérieure des spermatozoïdes incubés dans le milieu de dilution à base de lait à 37 °C (**Pellicer-Rubio et al , 1997**).

Selon (**Leboeuf et al., 2000**) ;il est probable que EYCE et SBUIII soient la même molécule . L'EYCE était identifié comme étant une phospholipase A (**Iritani et Nishikawa, 1961, 1963**), et SBUIII en tant que glycoprotéine lipase de 55-60 kDa provenant de la glande bulboburétrale de bouc (BUSgp60) (**Pellicer-Rubio et al , 1997**).

EYCE agit comme un catalyseur qui hydrolyse la lécithine de jaune d'œuf en acides gras et lysolécithine (**Iritani et Nishikawa, 1961, 1963**). Cette hydrolyse fait que les membranes des spermatozoïdes soient plus fusogènes , induisant ainsi la réaction de l'acrosome (**Upreti et al, 1999**), et la décondensation de la chromatine (**Sawyer et Brown, 1995**), qui est toxique pour le sperme (**Aamdal et al, 1965**). La lipase BUSgp60 a une

structure homologue avec les lipases pancréatiques porcines (**Carriere et al , 1994**) et, à l'instar de l'EYCE, la BUSgp60 est responsable de l'hydrolyse des triglycérides de la membrane plasmique et les triglycérides du lait écrémé qui se traduisent par la production des acides gras (production de lysolécithine avec le jaune d'œuf, et l'acide oléique avec les triglycérides du lait) qui est toxique pour sperme (**Pellicer-Rubio et al , 1997 ; Pellicer-Rubio et Combarnous, 1998**). Quels que soient les mécanismes de EYCE et BUSgp60, leur activation dans des diluants est préjudiciable à la qualité des spermatozoïdes pendant le refroidissement et la cryopréservation (**Pellicer-Rubio et al., 1997 ; Pellicer-Rubio et Combarnous, 1998**).

La méthode classique pour surmonter les interactions nocives entre le plasma séminal et le jaune d'œuf ou le lait est de diluer l'échantillon de sperme de caprin dans un diluant tamponné puis séparer le plasma séminal du sperme par centrifugation. Les cellules sont lavées soit une fois ou deux fois, chacune pendant 10-15 min à $550-950 \times g$ (**Nunes et al, 1982 ; Ritar et Salamon, 1982 ; Memon et autres, 1985 ; Singh et al , 1995 ; Leboeuf et al , 1998**).

Le lavage des échantillons de sperme, cependant, est un processus qui prend du temps et qui peut endommager les cellules si il est mal exécuté mais, s'il est effectué correctement, il peut être bénéfique. Les avantages de l'élimination du plasma séminal est donc variable . Certaines recherches indiquent que l'élimination du plasma séminal est nécessaire pour maximiser la motilité et l'intégrité acrosomiale après dégel pour la semence de bouc (**Drobnis et al , 1980 ; Ritar et Salamon, 1982 ; Memon et al , 1985**), tandis que d'autres font état de résultats positifs pour le sperme congelé sans lavage (**Ritar et Salamon, 1982 ; Azeredo et al , 2001**).

Des diluants alternatifs qui minimisent les interactions entre le sperme et la lipase ont été proposés notamment par l'ajout de diluants sans triglycérides contenant la caséine des protéines du lait ou du lait provenant d'espèces autres que la vache laitière où la structure des acides gras et des tris-glycérides diffèrent de sorte que les réactions enzymatiques ne se produisent pas (**Pellicer-Rubio et Combarnous, 1998**).

Kundu et al. (2000, 2001, 2002) ont démontré que le sperme de caprin peut être cryoconservé dans le jaune d'œuf et les milieux sans lait, mais ce travail a été effectué sur des spermatozoïdes épидидymaires, et non des cellules éjaculées.

2. Dilution et concentration des spermatozoïdes

Il est essentiel qu'un échantillon de sperme soit correctement dilué. Le but de la dilution est de fractionner un éjaculat en doses fécondantes tout en additionnant des substances qui assurent la survie des spermatozoïdes pendant la conservation.

Historiquement, les échantillons de sperme des animaux d'élevage ont été dilués soit en diluant le sperme avec des volumes spécifiques de diluants, soit en diluant le sperme à une concentration spécifique de spermatozoïdes. Des taux de dilution de 1:1-1:23 (v/v ; du sperme au diluant) ont été utilisés avec succès (**Evans et Maxwell, 1987 ; Ritar et al., 1990a,b**). Peut-être qu'une meilleure façon de diluer le sperme, à des fins de comparaison, est basée sur la concentration de sperme. Les rapports sur les spermatozoïdes ont été obtenus avec des échantillons dont la taille varie de de 80 à 500×10^6 cellules/ml (**Corteel, 1974 ; Ritar et al., 1990a,b ; Karatzas et al., 1997**).

3. Congélation et décongélation du sperme

3.1. Congélation

Le sperme de mâle dilué est refroidi à 4-5 °C pendant 1,5-4 h et ensuite congelé sous forme de pellets ou de pailles (**Evans et Maxwell, 1987 ; Chemineau et autres, 1991 ; Tuli et autres, 1991 ; Ritar ++, 1993 ; Gravance et al , 1997 ; Leboeuf et al , 2000**).

La congélation du sperme en pellets est rapide et peu coûteuse, mais la gestion des stocks est problématique car les échantillons de sperme ne peuvent pas être étiquetés. Une fois que l'échantillon de sperme est refroidi, les aliquotes de sperme de 0,1-0,3 ml sont distribués en creux sur un bloc de glace sèche (dioxyde de carbone solide ; -79 °C) et congelé pendant 2-4 min. Les pellets sont ensuite plongés dans l'azote liquide pendant 7-8 min. (**Evans et Maxwell, 1987 ; Chemineau et al, 1991**).

La congélation du sperme dans des pailles est plus coûteuse et laborieuse que la technique des pellets, mais chaque échantillon peut être étiqueté pour une gestion précise des stocks. Après avoir dilué et refroidi les échantillons de sperme, les spermatozoïdes sont chargés dans des pailles de 0,25 ou 0,5 ml, placées sur une grille, et congelé dans de la

vapeur d'azote liquide ; la température varie en fonction de la hauteur au-dessus de l'azote liquide. Toutefois, des hauteurs de congélation et des temps ont été cités, par exemple, 4-5 cm au-dessus de l'azote liquide pendant 4-5 min, avec des résultats acceptables (**Gravance et al , 1997 ; Leboeuf et al , 2000**).

Une boîte en polystyrène contenant de l'azote liquide ou un congélateur programmable qui contrôle la vitesse de refroidissement ont les deux ont été utilisés avec succès pour cryoconserver le sperme caprin. Lorsqu'on utilise une boîte en polystyrène, le portoir contenant les échantillons est placé dans la vapeur d'azote liquide à une hauteur de 3-4 cm au-dessus du liquide pour vapeur d'azote ;

Ritar et al. (1990a,b) ont rapporté que le sperme congelé en pellets permettait une meilleure motilité après décongélation (39%) par rapport au sperme congelé dans des pailles. Cependant, la motilité était similaire pour le sperme congelé dans des pailles 0,25 (33 %) et des pailles de 0,5 ml (34 % après décongélation). La différence de motilité après congélation, la viabilité et la fécondité peut être attribuée aux différentes vitesses de refroidissement produites par les méthodes des pellets et de la paille (**Ritar, 1993**), mais le choix de la méthode de cryoconservation utilisé devrait également tenir compte d'autres facteurs, tels que la facilité de manipulation, la main d'œuvre, la technique d'insémination et la gestion des stocks.

3.2. Décongélation

La décongélation des échantillons de sperme est déterminée par la méthode utilisée pour congeler le sperme. Les pellets de sperme doivent être décongelés dans une éprouvette sèche à 37° C , alors que la paille de sperme est placée dans un bain d'eau à 37 °C pendant 12 à 30 s (**Deka et Rao, 1987**).

L'augmentation de la température de la décongélation à 70 °C et décongélation de la paille de sperme pendant seulement 7 s a entraîné une motilité progressive de (36,9 %) et une intégrité de la membrane plasmique significativement plus élevée (39,8%) par rapport à la décongélation des pailles à 37 °C pendant 2 min(31,5%, 33,7% ; motilité progressive et intégrité de la membrane plasmique, respectivement), ou à 40 °C pendant 20 s (32,4%, 33,5% ; motilité progressive et l' intégrité de la membrane plasmique respectivement) ($P < 0,05$) ; (**Tuli et al, 1991**). L'attention portée à la température et au temps devient beaucoup plus critique à des températures supérieures à 37 °C, car ces températures élevées peuvent

entraîner d'énormes mortalités des spermatozoïdes si elles sont mal exécutées (**Tuli et al, 1991**).

4. Diluants de cryoconservation et cryoprotecteurs

4.1. Diluants

Le but d'un diluant de cryoconservation est d'alimenter les spermatozoïdes en source d'énergie, de protéger les cellules des dommages liés à la température, et maintenir un environnement propice à la survie des spermatozoïdes temporairement. En toute logique, chacun des différents composants des milieux a été étudié séparément et en combinaison, afin de maximiser la viabilité après congélation et la fertilité des spermatozoïdes. En général, les milieux de conservation de sperme de caprin comprend un cryoprotecteur non pénétrant (lait et le jaune d'œuf), un cryoprotecteur pénétrant (glycérol, éthylène glycol, ou diméthyle sulfoxyde), un tampon (Tris ou Test), un ou plusieurs sucres (glucose, lactose, raffinose, saccharose ou tréhalose), les sels (citrate de sodium, acide citrique) et les antibiotiques (pénicilline, streptomycine) (**Evans et Maxwell, 1987**).

Le diluant de lait écrémé séché non gras (**Corteel, 1974**) ou le diluant de Tris-glucose (**Salamon et Ritar, 1982**) sont le plus souvent utilisés pour la cryoconservation du sperme de caprin. Des modifications de ces diluants ont été étudiées avec des résultats variables (**Evans et Maxwell, 1987 ; Singh 1995 ; Keskinetepe et al. 1998 ; Blash et al. 2000**).

Ces études ont tenté de répondre à des questions récurrentes de savoir s'il existe des moyens de cryoconservation optimaux, le sperme de bouc a-t-il une préférence pour un milieu particulier, et quel est la meilleure concentration du constituant. Pour répondre à ces questions, des spécificités concernant les milieux de cryoconservation du sperme de caprin (osmolalité, pH et tampons, sucres, cryoprotecteurs) sont présentés de manière à ce que leurs effets sur le sperme soient compris et, par conséquent, leur inclusion ou l'exclusion d'un diluant.

4.2. Osmolalité

Les spermatozoïdes de caprins survivent à la cryoconservation et restent fertiles dans des milieux composés d'un large éventail de constituants. De nombreux sucres, sels et tampons différents, par exemple peuvent être inclus dans la variation des concentrations molaires dans le milieu de cryoconservation, sans endommager les spermatozoïdes. Alors

que l'osmolalité du milieu peut varier dans certaines limites, les spermatozoïdes de caprin préfèrent un milieu hyperosmotique pour la cryopréservation. **Salamon et Ritar (1982)** ont observé que la tonicité optimale d'un milieu de sperme de bouc à base de tris-glucose-acide - citrique pour être 948 kPa (540 mOsm). La conclusion selon laquelle il s'agit de la tonicité optimale pour ce milieu a été déterminée en comparant les combinaisons de tampon Tris et de sucres, dans des concentrations osmotiques variables, qui se situaient entre 737 et 1112 kPa (**Salamon et Ritar, 1982**). En outre, **Bowen et al. (1988)** ont signalé des dommages moins importants dans le sperme de caprin congelé dans des diluants ayant des osmolalités comprises entre 425 et 525 mOsm, par rapport aux milieux ayant une osmolalité de 325 ou 625 mOsm.

4.3. pH et systèmes tampons

De grandes variations du pH du sperme peuvent entraîner des dommages, l'infertilité ou la mortalité des spermatozoïdes. Par conséquent, afin de maintenir la viabilité et la capacité de fertilisation du sperme, il est essentiel de maintenir un environnement adéquat en contrôlant les fluctuations du pH dans les milieux de cryoconservation. L'une des fonctions du plasma séminal est de protéger les spermatozoïdes contre les changements pH, mais cela est censé se produire *in vivo* et non sous les conditions *in vitro* qui se produisent pendant la cryoconservation (**Mann, 1954**). C'est pourquoi les substances qui servent de tampons des variations de pH sont systématiquement prises en compte dans les milieux de cryoconservation pour minimiser les changements. En général, les solutions tampons pour le sperme de caprin doivent avoir un pKa de 7,0 (gamme de pH de 6,0 à 8,0), doivent être solubles dans l'eau et imperméable, avoir des interactions minimales avec les sels, être peu affecté par la concentration du tampon, la température et le contenu ionique lors de la dissociation du tampon, avoir des propriétés de complexation des métaux, et être capables de résister à la dégradation enzymatique et non enzymatique (**Bonne et al, 1966 ; Graham et al, 1972**).

Plusieurs études ont déterminé les effets du pH sur le sperme de bouc, le pH du milieu de cryoconservation n'est pas souvent signalé.

Le pH des diluants de sperme de bouc à base de jaune d'œuf ou de lait, devrait normalement se situer entre 6,75 et 6,8 (**Ritar et Salamon, 1982 ; Salamon et Ritar, 1982 ; Deka et Rao, 1987 ; Tuli et Holtz, 1992 ; Chauhan et al., 1994**).

Fukuhara et Nishikawa (1973) ont observé le pH de diluant pour maximiser la respiration et la motilité du sperme de caprin. L'absorption d'oxygène du sperme de bouc est maximale entre pH 7,2 et 7,5 et la motilité des spermatozoïdes est optimale entre un pH de 7,0 et 7,2, ce qui indique qu'un milieu optimal pour la survie du sperme de caprin in vitro devrait être de 7,2 (**Fukuhara et Nishikawa, 1973**).

La concentration des additifs tampons affecte la viabilité du sperme de caprin.

Salamon et Ritar (1982) ont étudié le tris(hydroxyméthyl) aminométhane (Tris) dans une gamme de concentrations et a enregistré une interaction entre la concentration de Tris et les sucres présents dans le milieu. La motilité après le dégel était plus importante avec le tampon Tris, à n'importe quelle concentration (300, 375, ou 450 mM), en combinaison avec 21, 42 ou 62 mM glucose (la motilité totale moyenne de toutes les concentrations de glucose, 33%) ou fructose (33%). L'ajout de lactose (29 %) ou le raffinose (17 %) ont donné des pourcentages plus faibles de cellules mobiles (**Salamon et Ritar, 1982**). Il a été conclu que dans les conditions testées, le sperme de mâle préfère le fructose ou le glucose, lorsqu'ils sont combinés avec le Tris, et que la concentration des sucres requise est très petite (0-62,4 mM) pour une cryoconservation réussie (**Salamon et Ritar, 1982**). Autres constatations signalées des effets cryoprotecteurs plus importants pour les monosaccharides que les disaccharides, lorsqu'ils sont utilisés en combinaison avec Tris (**Molinia et al , 1994a**). En outre, le sperme de caprin peut survivre à un large éventail de concentrations de Tris (300-600 mM), mais l'osmolalité totale de la solution est importante. La combinaison du sucre et du Tris (737-1112 kPa) a eu un impact sur le succès du milieu de cryoconservation (**Salamon et Ritar, 1982**).

Alors que les recherches précédentes portaient sur l'optimisation de la concentration du tampon Tris. **Tuli et Holtz (1992)** a essayé de déterminer quel tampon zwitterion, Bes, Tes, Test, ou Tris, était le plus compatible avec le sperme de bouc dans un milieu de cryoconservation. Les expériences utilisées un diluant jaune d'œuf-fructose qui varie, selon le type de tampon, mais ils ont tous été titrés à un pH de 6,75. Une motilité progressive significativement plus importante (44 %) et un pourcentage de cellules vivantes (49 %) ont été observés dans les échantillons de sperme.

La question reste posée quant au mécanisme par lequel ces tampons affectent les spermatozoïdes. De nombreuses théories relatives à l'action des tampons ont été proposées, mais on pense généralement que les tampons contribuent au processus de déshydratation cellulaire en créant une force osmotique (**Molinia et al , 1994b**), augmentant ainsi la stabilité

physique de la membrane plasmique des spermatozoïdes et neutralisant les acides générés lors de la conservation in vitro (**Ijaz et al , 1989**). Certains résultats de la recherche sur les tampons sont surprenants, notamment en ce qui concerne la large utilisation et les résultats positifs obtenus avec le Tris. Comme indiqué précédemment, le Tris semble être le tampon de choix pour le sperme de bouc , mais ce n'est pas le cas chez d'autres espèces où on a observé des aspects négatifs du tampon, tels que l'augmentation de la capacité et de la vitesse de la réaction acrosomique , et le gonflement de la crête apicale du spermatozoïde, ont été documentés (**Molinia et al , 1996 ; Ijaz et al , 1989**). Chez d'autres espèces de mammifères (bovins et ovins), le Tris est un mauvais tampon, en particulier en dessous d'un pH de 7,5, où il est incapable de résister aux fluctuations de température. Le pH du milieu peut diminuer jusqu'à 1 unité de pH lorsque le milieu Tris est chauffé de 0 à 37 °C (**Graham et al , 1972 ; Ijaz et al , 1989 ; Molinia et al , 1994b**). Néanmoins, des résultats positifs ont été signalés avec le Tris chez les caprins, les taureaux et les béliers, mais comme les valeurs du pKa de ce milieu et de tous les tampons sont différentes, les comparaisons directes ne sont pas totalement valables (**Good et al., 1966**). Il ne s'agit pas d'une liste exhaustive des composés tampons qui ont été testés pour la cryoconservation du sperme de caprin, mais elle illustre la raison de l'inclusion de l'un de ces composés dans un milieu et la raison de la popularité du tampon Tris.

4.4. Sucres

Il est logique d'inclure des sucres dans un diluant de cryoconservation, car le plasma séminal contient des sucres. Le sperme de bouc utilise facilement le fructose, le glucose, le lactose et d'autres sucres pour la respiration, et ces sucres assurent également l'équilibre osmotique et la cryoprotection, mais de tous les sucres, le fructose a la plus grande concentration molaire dans le sperme de bouc pur (**Mann, 1954 ; Corteel, 1973 ; Salamon et Ritar, 1982 ; Aboagla et Terada, 2003**). Les diluants de sperme contiennent divers sucres, avec une large gamme d'osmolalités (6-375 mM) (**Corteel, 1974 ; Ritar et Salamon, 1982 ; Salamon et Ritar, 1982 ; Evans et Maxwell, 1987**). Le choix du sucre à inclure dans un diluant peut être basé sur la fonctionnalité du produit chimique. Le fructose est le principal substrat pour la glycolyse dans le plasma séminal du bouc , il est donc logique d'inclure ce sucre dans le milieu de conservation (**Pellicer-Rubio et al , 1997**). De même, le glucose est un excellent substrat dans le métabolisme du sperme de bouc et il est essentiel pour fournir de l'énergie afin que les spermatozoïdes puissent fonctionner de manière physiologique normale (**Fukuhara et Nishikawa, 1973 ; Corteel, 1974**).

Corteel (1974) a démontré que le sperme de bouc gelait mieux dans un diluant de lait si le plasma séminal était retiré du sperme. Il était donc nécessaire que ce milieu de cryoconservation contienne du glucose afin de disposer d'une source d'énergie facilement accessible pour les spermatozoïdes et d'obtenir une plus grande motilité (30 % de motilité avec du glucose, contre 10 % sans glucose ; $P < 0,05$) après la cryoconservation (**Corteel, 1974**).

Ces résultats sont en accord avec ceux **Nishikawa (1973)** qui a décrit le rôle du plasma séminal, à savoir son but de fournir de l'énergie et une protection aux spermatozoïdes. Par conséquent, ces mêmes critères sont nécessaires pour un milieu de cryoconservation, en particulier lorsqu'on utilise des spermatozoïdes qui ont été lavés de leur plasma séminal. Jusqu'à présent, la discussion sur les sucres s'est limitée aux molécules de faible poids moléculaire (fructose et glucose) qui peuvent passer à travers la membrane plasmique d'un spermatozoïde. Divers effets peuvent être observés lorsque des sucres qui ne sont pas capables de diffuser à travers une membrane plasmique, tels que le lactose, le saccharose, le raffinose, le tréhalose ou les dextrans, sont ajoutés au diluant. Dans ces cas, les sucres créent une pression osmotique, induisant une déshydratation des cellules et donc une moindre incidence de formation de cristaux glace intracellulaire. Ces sucres interagissent également avec les phospholipides de la membrane plasmique, réorganisant la membrane, ce qui permet aux spermatozoïdes de mieux survivre au processus de cryoconservation (**Molinia et al., 1994a ; Aisen et al , 2002**). Contrairement aux sucres simples qui sont le glucose et le fructose, ces disaccharides agissent principalement comme cryoprotecteurs.

Plus récemment, le tréhalose a été inclus dans les diluants de cryoconservation du sperme de caprin. **Aboagla et Terada (2003)** ont rapporté que le tréhalose agissait comme cryoprotecteur dans les diluants à base d'acide tris-citrique et de glucose (TCG) développés à l'origine par **Salamon et Ritar (1982)**.

Des spermatozoïdes de bouc lavés ont été dilués et congelés dans le milieu TCG contenant 0, 93,75, 187,5, 281,25 ou 375 mM de tréhalose (**Aboagla et Terada, 2003**). La motilité post-décongélation du sperme congelé en présence de 375 mM de tréhalose a entraîné une motilité totale du sperme significativement plus élevée (78%), une motilité progressive (61%) et une vitesse de parcours (96 /s), par rapport au traitement au tréhalose 0 mM (62%, 49%, 81 /s, respectivement) ($P < 0,05$). En outre, l'évaluation par cytométrie de flux de la fluidité membranaire du sperme de bouc avant la cryoconservation a révélé que les membranes

plasmiques du sperme traité au tréhalose étaient plus fluides à 38 °C, par rapport aux membranes plasmiques du sperme de bouc non traité (Aboagla et Terada, 2003). Le mécanisme exact par lequel le tréhalose et d'autres sucres non pénétrants affectent la membrane du sperme est inconnu, mais on suppose que ces sucres pénètrent dans la membrane plasmique des spermatozoïdes et forment des liaisons hydrogènes avec les groupes polaires des phospholipides (Liu et al., 1998 ; Aboagla et Terada, 2003). L'insertion de ces disaccharides dans la membrane limite la quantité de déshydratation qui peut se produire, et par conséquent les dommages physiques dus aux changements de volume cellulaire associés à la congélation et à la décongélation (Liu et al., 1998). Le tréhalose provoque également une augmentation de la fluidité de la membrane due à la réorganisation des protéines et des phospholipides, une suppression des effets nuisibles de la transition de phase des lipides membranaires et, par conséquent, une déshydratation des cellules à des températures plus basses que si un disaccharide n'avait pas été utilisé (Terada, 2003), ce qui signifie que les dommages cellulaires sont minimisés grâce à une moindre formation de glace intracellulaire et, par conséquent, à la récupération de cellules plus viables après la cryoconservation (Aboagla et Terada, 2003).

5. Cryoprotecteurs

Un cryoprotecteur est incorporé dans un milieu de cryoconservation pour minimiser les contraintes physiques et chimiques résultant du refroidissement, de la congélation et de la décongélation des spermatozoïdes. Les cryoprotecteurs sont classés comme pénétrants ou non pénétrants. Un cryoprotecteur pénétrant est perméable à la membrane et agit au niveau intra- et extra-cellulaire. Les cryoprotecteurs pénétrants sont des solutés, qui provoquent la déshydratation des spermatozoïdes en raison du flux d'eau entraîné par l'osmose, qui varie selon le composé. Après de courtes périodes de temps, le cryoprotecteur et l'eau s'équilibrent et donnent lieu à des concentrations intra et extracellulaires similaires (Amann, 1999). Comme le spermatozoïde a à ce moment moins d'eau intracellulaire, le point de congélation de la cellule est diminué et il y aura moins de formation de glace intracellulaire, ce qui est bénéfique, car la glace intracellulaire entraîne la mort de la cellule, et donc une réduction de la fertilité de l'échantillon de sperme.

Les cryoprotecteurs pénétrants provoquent également un réarrangement des lipides et des protéines membranaires, qui se traduit par une plus grande fluidité de la membrane, une plus grande déshydratation à basse température, et donc une plus grande capacité à survivre à

la cryoconservation (**Holt, 2000**). En outre, les cryoprotecteurs pénétrants sont des solvants qui dissolvent les sucres et les sels dans le milieu de cryoconservation. Un cryoprotecteur non pénétrant ne peut pas traverser la membrane plasmique du sperme et n'agit donc que de manière extracellulaire (**Amann, 1999**). Par conséquent, un cryoprotecteur non pénétrant peut modifier la membrane plasmique d'une cellule, ou agir comme un soluté et abaisser la température de congélation du milieu (**Amann, 1999**).

De nombreux cryoprotecteurs perméables aux membranes (glycérol, diméthyl sulfoxyde, éthylène glycol et propylène glycol) et leurs combinaisons ont été testés avec du sperme de bouc (**Ritar et al , 1990a,b ; Tuli et Holtz, 1994 ; Singh et al , 1995 ; Kundu et al , 2000 ; Leboeuf et al , 2000**) mais le cryoprotecteur pénétrant le plus fréquemment utilisé est le glycérol. L'ajout de glycérol peut être effectué selon une méthodologie en 1, 2 ou 3 étapes sur 37 °C ou 5 °C (**Corteel, 1974 ; Salamon et Ritar, 1982 ; Tuli et Holtz, 1994 ; Leboeuf et al , 2000**). La concentration finale (v/v) d'un cryoprotecteur pénétrant dans un milieu varie, mais elle est déterminée par la toxicité du produit chimique et son effet bénéfique sur les spermatozoïdes. Le glycérol, le diméthyl sulfoxyde (Me2SO) et l'éthylène glycol sont généralement utilisés dans une fourchette de 1 à 8 %, mais la plus grande récupération des spermatozoïdes après la décongélation a été obtenue avec le glycérol (**Tuli et Holtz, 1994 ; Singh et al , 1995 ; Kundu et al , 2000**). Des combinaisons de cryoprotecteurs, tels que le glycérol et le Me2SO, ont également été utilisées et ont donné des résultats positifs. **Kundu et al. (2000)** ont observé que l'utilisation du glycérol (6 %) seul comme cryoprotecteur, entraînait des pourcentages plus élevés de spermatozoïdes mobiles après cryoconservation (35 %), par rapport aux spermatozoïdes congelés à l'aide d'éthylène glycol (13 %) ou de Me2SO (21 %). L'utilisation du glycérol (6%) et du Me2SO (5,9%) permet d'obtenir un effet synergique des cryoprotecteurs. La motilité post-décongélation utilisant séparément le glycérol et le Me2SO était de 33% et 15%, respectivement, tandis que la combinaison des cryoprotecteurs a permis d'obtenir 45% de spermatozoïdes mobiles (**Kundu et al , 2001**).

L'ajout de glycérol peut induire des dommages osmotiques aux spermatozoïdes, mais l'ampleur des dommages varie selon les espèces. Cependant, les spermatozoïdes de caprins sont raisonnablement tolérants à ces conditions osmotiques et peuvent supporter une exposition rapide au glycérol. Des essais testant l'ajout par étapes de glycérol ont donné des résultats variables, en fonction de la température à laquelle le glycérol est ajouté.

Salamon et Ritar (1982) ont rapporté une addition de glycérol en une seule étape à des échantillons de sperme 30 °C pour obtenir des spermatozoïdes plus mobiles, par rapport à une glycérolisation en 2 étapes à 30 °C, ou une glycérolisation en 2 étapes à des températures décroissantes (dilution du glycérol à 30 °C et à 5 °C). **Tuli et Holtz (1994)** ont rapporté une méthode de glycérolisation par étapes à 37 °C pour obtenir des proportions similaires de spermatozoïdes progressivement mobiles et vivants, par rapport à une glycérolisation en une étape à 37 °C, ou une dilution par étapes à 5 °C - mais la méthode de glycérolisation par étapes à 37 °C avait une libération de GOT(glutamic oxaloacétic transaminase) significativement inférieure (99 unités/ml) après décongélation par rapport aux autres méthodes (105 et 108 unités/ml, respectivement ; $P < 0,05$). Il ressort de ces résultats que le glycérol peut être ajouté aux spermatozoïdes en une seule fois.

Les cryoprotecteurs non pénétrants les plus couramment utilisés sont le jaune d'œuf (2 à 20 %) (**Ritar et Salamon, 1982 ; Tuli et Holtz, 1994**) et le lait écrémé non gras (10 %, v/v) . (**Corteel, 1974 ; Leboeuf et al , 1998**) ont également identifié d'autres produits chimiques imperméables à la membrane qui peuvent être utilisés comme cryoprotecteurs.

Kundu et al,(2001), en utilisant du sperme de l'épididyme et un milieu sans jaune d'œuf ni glycérol, ont démontré que les acides aminés (l-proline, l-alanine, glycine ou lglutamine ; 100-150 mM) pouvaient être utilisés comme cryoprotecteurs dans les milieux de cryoconservation du sperme de caprin et donner de meilleurs résultats après le décongélation (8-14% de motilité avant et 11-19% de récupération totale de la motilité), par rapport à un groupe témoin (0% de cellules mobiles avec 0 mM d'acides aminés). Les acides aminés ont exercé une protection encore plus grande lorsqu'ils étaient combinés avec du glycérol (0,87 M) et du diméthyl sulfoxyde (0,76 M), ce qui a permis d'obtenir une motilité progressive de 50 à 55 % après la décongélation (**Kundu et al , 2001**). Les dextrans (10-2000 kDa) peuvent également être utilisés comme cryoprotecteurs non pénétrants dans le même milieu sans jaune d'œuf et sans glycérol, et donnent une motilité totale et progressive de 23 et 25%, après la décongélation (**Kundu et al , 2002**). Les pourcentages les plus élevés de motilité descendante (58 %) et de motilité totale (60 %) ont été enregistrés avec 6,27 mM de dextran 10 kDa en combinaison avec du glycérol (0,87 M) et du diméthyl sulfoxyde (0,76 M) par rapport au témoin (22 % de motilité descendante et 25 % de motilité totale des spermatozoïdes). **Kundu et ses collaborateurs (2002)** ont émis l'hypothèse que la combinaison du glycérol, du Me2SO et du dextran avait un effet bénéfique additif pendant la cryoconservation, en raison des masses moléculaires des différents produits chimiques. Le glycérol et le Me2SO sont

perméables à la membrane et, par conséquent, déshydratent les spermatozoïdes et minimisent la formation de glace intracellulaire. Comme le dextran est imperméable à la membrane, son effet sera plus important en dehors du spermatozoïde, très probablement en interrompant la formation de glace extracellulaire (**Kundu et al , 2002**). Par conséquent, cette combinaison de substances chimiques entraîne une action cryoprotectrice à la fois intracellulaire et extracellulaire.

Le mécanisme par lequel les cryoprotecteurs pénétrants et non pénétrants fonctionnent n'est pas encore totalement compris, mais les recherches les plus récentes sont prometteuses pour élargir la compréhension du fonctionnement des cryoprotecteurs, et devraient donc améliorer les méthodes de congélation actuelles.

6. 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 phosphocaséinate 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 inférieures 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**). **Eppeleston et al , 1994**) ont montré que les spermatozoïdes de boucs déposés par IA intra-utérine demeuraient 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 peroxydase (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, améliorent 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**).

7. Conclusion

- La revue des études antérieures démontre l'importance de retirer le plasma séminal lorsque le diluant contient plus de 1,5 % de jaune d'œuf.
- La fertilité du sperme de mâle congelé en pellets et pailles est similaire, c'est pourquoi il a recommandé que le sperme de bouc soit congelé en pailles afin que la gestion des stocks puisse être plus précise.
- Pour maximiser la récupération post-dégel des spermatozoïdes mobiles et viables congelés avec le diluant de jaune d'œuf Tris, les paillettes de sperme devraient être placées à 4 cm au-dessus de l'azote liquide pendant 4,5 min.
- Les pailles de sperme de bouc doivent être décongelées pendant 20-30 s dans un bain-marie de 37 °C.
- 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.
- Plusieurs méthodes de congélation existent. Pour améliorer la qualité de la semence après décongélation.
- L'ajout d'antioxydants dans le milieu de dilution à base de Tris améliore la survie des spermatozoïdes.
- L'ajout de la vitamine E dans le milieu à base de lait écrémé prévient la peroxydation des lipides membranaires des spermatozoïdes.
- Le sperme de bouc se conserve mieux dans un milieu hyper osmotique.

8. Recommandation

- Il serait plus intéressant de focaliser sur la compréhension approfondie de la physiologie du sperme de caprin et permettre des comparaisons plus valables de la recherche parce que la manipulation et la congélation du sperme de caprin sera identique.

- Il serait intéressant de recommander l'usage de dilueurs exemptes de protéines d'origine animale (lait, jaune d'œuf ...etc.).

Références bibliographiques

Aamdal, J., Lyngset, O., Fossum, K., 1965. Toxic effect of lysolecithin on sperm. A preliminary report. *Nord. Vet. Med.* 17, 318–319.

Abecia . J. A., Valaresa J. A., Forcada F., Palacini. et Martin S., 2007. The effect of melatonin on the reproductive performance of threesheepbreeds in Spain. *Small Rumin. Res.*, **69**: 10-16.

Aboagla, E.M.E., Terada, T., 2003. Trehalose-enhanced fluidity of the goat sperm membrane and its protection during freezing. *Biol. Reprod.* 69, 1245–1250.

Aisen, E.G., Medina, V.H., Venturino, A., 2002. Cryopreservation and post-thawed fertility of ram semen frozen in different trehalose concentrations. *Theriogenology* 57, 1801–1808.

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- Illinois, vol. 2, Abstract n° 50.

Albert et Jean., 2001. « Biologie du développement » .5ème édition de l'abrégé.

AL-Shorepy et Notter , 1997. Response to selection for fertility in a fall-lambingsheepflock. *J. Anim. Sci.*, **75**: 2033-2040.

Amann, R.P., 1999. Cryopreservation of sperm. In: Knobil, E., Neill, J.D. (Eds.), *Encyclopedia of Reproduction*. Academic Press, Burlington, MA, pp. 773–783.

Amoah, E.A., Gelaye, S., 1997. Biotechnological advances in goat reproduction. *J. Anim. Sci.* 75, 578–585.

Andersan -Ranberg I. M., Heringstad B., Gianola., Chang Y. M. et Klemetsdal G., 2005a. Comparison between bivariate models for 56-day nonreturn and interval from calving to first insemination in Norwegian red. *J. DairySci.*, **88**: 2190-2198.

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.

Anel et al., 2006 ; Grimard et al., 2006 ; Nadarah et al., 1988 ; Stalhammar et al., 1994).

- Anel L., Alvarez M., Martinez –Pastor F., Garcia –Macias V., et Anel E., 2006.** Improvement strategies in ovine artificial insemination. *Reprod. Dom. Anim.*, **41**: 30-42.
- Anel L., Kaabi M., Abroug B., et Alvarez M. 2005.** Factors influencing the success of vaginal and laparoscopic artificial insemination in churra ewes: a field assay. *Theriogenology*, **63**: 1235-1247.
- Averill T. A., Rekaya R. et Weigel K., 2004.** Genetic analysis of male and female fertility using longitudinal binary data. *J. Dairy Sci.*, **87**:3947-3952.
- Azeredo, G.A., Esper, C.R., Resende, K.T., 2001.** Evaluation of plasma membrane integrity of frozen-thawed goat spermatozoa with or without seminal plasma. *Small Rumin. Res.* **41**, 257–263.
- Barbat A., Druet T., Bonaiti B., Guillaume F. et Colleau J. 2005.** Overview of phenotypic fertility results after artificial insemination in the three main french dairy cattle breeds. *Rencontres Recherches Ruminants*, **12** : 137-140.
- Baril G, Chemineau P, Cognié Y, 1993.** « Manuel de formation pour l'insémination artificielle chez les ovins et les caprins ».
- Barone R., 1978.** « Anatomie comparée des mammifères domestiques ». Tome 3, splanchnologie, Fascicule 2, appareil urogénital, 951p.p89-447.
- Barone, R, 2001.** Anatomie comparée des mammifères domestique Vol 4, splanchnologie II, 3ème édition Edition Paris, France, 896 p.
- Barrabes Aneas S, Gary BG, Bouvier BP, 2008.** Collectis® automated boar collection technology. *Theriogenology* **70**: 1368-1373.
- Batellier, F, Magistrini, M, Fauquant, J & Palmer, E 1997** Effect of milk fractions on survival of equine spermatozoa. *Theriogenology* **48** 391 -410.
- Belhamiti T, 2006** these magister VARIATIONS DE LA PRODUCTION SPERMATIQUE, INSEMINATION ARTIFICIELLE ET DIAGNOSTIC DE LA GESTATION PAR ECHOGRAPHIE CHEZ LES CAPRINS DE LA RACE LOCALE DANS LA REGION DE TIARET.
- Bister J.L., 2006.** Analyse de certains paramètres pouvant influencer les résultats d'insémination artificielle chez la brebis. *Filière Ovine et Caprine (11)* : 45-60.
- Bizimugu J., 1991.** L'insémination artificielle bovine au Rwanda : bilan et perspectives. Thèse : Méd. Vét. : Dakar ; 15.

Blash, S., Melican, D., Gavin, W., 2000. Cryopreservation of epididymal sperm obtained at necropsy from goats. *Theriogenology* 54, 899–905.

Bodin L., Drion P. V., Remy B., Brice G. et Cognie Y., 1997. Anti-PMSG antibody levels in sheep subjected annually to oestrus synchronisation. *Reprod. Nutr. Dev.*, **37**: 351-360.

Bodin L., Elsen J. M., Hanocq E., François D., Lajous D., et al., 1999. Génétique de la reproduction chez les ruminants. *INRA Prod. Anim.*, **12**: 87-100.

Boichard D. et Manfred I E., 1994. Genetic analysis of conception rate in French Holstein cattle. *Acta Agriculturae Scandinavica. Section A, Animal Science*, **44**: 138-145.

Bonne et al., 1988. Reproduction des mammifères d'élevages; collection inrap. édition foucher, 239p, p43-52.

Boué et Corteel 1992. Aptitude of male goat sperm to withstand freezing: combined effects of season and time of sexual rest between two successive semen collections. (1042 – 1045) In: Lokeshar R.R. (ed), *Recent Advances in Goat Productions. Proc. 5th Intl Conf. on Goats, New-Delhi, Vol 2*

Boukhlik R ,2002 « Cours en ligne sur la reproduction ovine » Institut Agronomique et vétérinaire Hassan II. Département de reproduction animale.

Bowen, J.A., Fonda, E.S., Kooyman, D.L., 1988. Ultrastructural study of goat spermatozoa frozen at different diluent osmolalities. In: *Proceedings of the Western Section, American Society of Animal Science. J. Anim. Sci.* (39) 312–315.

Branca A, Cappai P, 1989. « Osservazioni sul controllo della riproduzione nelle specie caprina: esperienze effettuate in Sardegna ». *Symp. Intl. La riproduzione nei piccolo ruminante: basi fisiologiche e aspetti applicative, Varese*, 115-129.

BRICE, G., BARIL, G., BROQUA, C., HUMBLLOT, P. et TERQUI, M., 2007. L'insémination artificielle chez les petits ruminants. *Le Point Vétérinaire*, 28, **185**:1641-1647.

BUNGE R., THOMAS D. L. et STOOKEY J. M., 1990. Factors affecting productivity of rambouillet ewes mated to ram lambs. *J. Anim. Sci.*, **68**: 2253-2262.

Butler W. R., 1998. Review: effect of protein nutrition on ovarian and uterine physiology in dairy cattle. *J. Dairy Sci.*, **81**: 2533-2539.

Cameron C.D., 1977. The Effect Method of Stimulation on Response to electro-ejaculation. *Aust. Vet. J.*, 58: 380- 383.

Carriere, F., Thirstrip, K., Boel, E., Verger, R., Thim, L., 1994. Structure-function relationships in naturally occurring mutants of pancreatic lipase. *Protein Eng.* 7, 563–569.

Chauhan, M.S., Kapila, R., Gandhi, K.K., Anand, S.R., 1994. Acrosome damage and enzyme leakage of goat spermatozoa during dilution, cooling and freezing. *Andrologia* 26, 21–26.

Chavette P, 1992. « Examen de la fonction génitale de l'étalon » *Rec. Med. Vét.*, 168 (6/7), 395-410.

Chemineau G.; Leboeuf B. ; Maurel M.Co; Roy F.; Pellicer-Rubio M.; Malpaux B. et Cognie Y.,1999. Implications des progrès récents en physiologie de la reproduction pour la conduite de la reproduction dans l'espèce caprine *INRA Prod. Anim.*, 12 : 135-146.

Chemineau P, Delgadillo J.A, 1994. « Neuroendocrinologie de la reproduction chez les caprins » *INRA. Prod. Anim.* 7 (5), 315-326.

Chemineau, P., Baril, G., Leboeuf, B., Maurel, M.C., Roy, F., Pellicer-Rubio, M., Malpaux, B., Cognie, Y., 1999. Implications of recent advances in reproductive physiology for reproductive management of goats. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 54, 129–142.

Chemineau, P., Cagnie, Y., Guerin, Y., Orgeur, P., Vallet, J.C., 1991. Training manual on artificial insemination in sheep and goats.

Cheng F. P., Wu J. T., Chan J. P., wang J. S. et Fung H. P., 2004. The effect of different extenders on post-thaw sperm survival, acrosomal integrity and longevity in cryopreserved semen of Formosan Sikadeer and Formosan Sambardeer. *Theriogenology*, **61**: 1605-1616.

Choong, C H & Wales, R G 1963 The use of various diluents for deep-freezing bull spermatozoa. *Aust J Biol Sci* 16 896-904.

Colenbrander B., Gadella B. M. et Stout T. A., 2003. The predictive value of semen analysis in the evaluation of stallion fertility. *ReprodDomest. Anim.*, **38**: 305-311.

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, processing and artificial insemination of goat semen » dans « Goat production. de Gall C., Academic press.

Corteel, J.M., 1973. L'insemination artificielle caprine: bases physiologiques, etat actual et perspectives d'avenir (artificial insemination of goats: physiological bases, present state and future prospects). *World Rev. Anim. Prod.* 9, 73–99.

Corteel, J.M., 1974. Viabilite des spermatozoids de bouc conserves et congeles avec ou sans leur plasma seminal: effet du glucose (viability of goat spermatozoa deep frozen with or without seminal plasma: glucose effect). *Ann. Biol. Anim. Biochem. Biophys.* 14, 741–745.

Corteel, J.M., 1974. Viabilite' des spermatozoids de bouc conserves et congelés avec ou sans leur plasma seminal: effet du glucose (viability of goat spermatozoa deep frozen with or without semi- nal plasma: glucose effect). *Ann. Biol. Anim. Biochem. Biophys.* 14, 741–745.

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.

Courtens, J.L., Alencar, A., Gatti, J.L., Dacheux, F., Dacheux, J.L., Guerin, Y., 1998. Factors affecting male fertility in domestic mammals. *Rencontres Recherches Ruminants* 5, 31–36.

Craaq . 2009. L'élevage de la chèvre, 439 pp.

Cseh, S, Faigl, V & Amiridis, G S 2012 Semen processing and artificial insemination in health management of small ruminants. *Anim Reprod Sci* 130 187-92.

Dacheux F, Dacheux J-L., 2001. « L'épididyme et les glandes annexes » dans « La reproduction chez les mammifères et l'homme » de Thibault C et Levasseur M-C. INRA, édition ellipses.

Dadoune J-P., Demoulin A., 2001. « Structure et fonction du testicule » dans ‘‘La reproduction chez mammifères et l'homme’’ de C. THIBAUT, Levasseur édition marketing, p 256 à 288.

Dadoune J-P., Demoulin A., 2001. «Structure et fonction du testicule» dans □La reproduction chez mammifères et l'homme de C. THIBAUT, Levasseur édition marketing, p 256 à 288. DE cremoux et al ,2005 Évaluation de l'incidence de la période de canicule de 2003 sur la reproduction chez la chèvre.

Deka, B.B., Rao, A.R., 1987. Effect of extenders and thawing methods on post-thawing preservation of goat semen. *Ind. Vet. J.* 64, 591–594.

Delgadillo J.A.. Malpaux B. et Chemineau P., 1997. **La reproduction des caprins dans les zones tropicales et subtropicales.** *INRA Prod. Anim.* 10 : 33-41.

Delgadillo, J.A., Hochereau-de Reviere, M.T., Daveau, A., Chemineau, P., 1995. Effect of short

Dérivaux J, 1971. « Reproduction chez les animaux domestiques ». Tome 1 et 2. Edition Déronaux, Liège.

Deriveaux J. et ECTORS F., 1989. Reproduction chez les animaux domestiques. Vol.1 : - Paris : Académia. -155p

Donovan A., Hanrahan J. P., Kummen E., Duffey P. et Boland M. P., 2004. Fertility in the ewe following cervical insemination with fresh or frozen-thawed semen at a natural or synchronized oestrus. *Anim. Rep. Sci.*, **84**: 359-368.

Drion P-V, Beckers J.F, Ectors F, 1993. «Physiologie de la reproduction». Université de Liège, Faculté de médecine vétérinaire **Dumont P., 1997.** «Point Vétérinaire». Vol 28.n°185, Août –Septembre

Drobnis, E.Z., Nelson, E.A., Burrill, M.J., 1980. Effect of several processing variables on motility and glutamic oxalacetic transaminase levels for frozen goat semen. I. Diluent. *J. Anim. Sci. Suppl.* 51, 439 (Abstract).

Dumont P. ,1997. « Points Veterinaire ». Vol28n°185, Aout –Septembre.

Dupoy J-P., 1993. « Hormones et grandes fonctions », tome2, pages512, p419-445, ed marketing.

Evans, G., Maxwell, W.M.C., 1987. Frozen storage of semen. In: Salamon's Artificial Insemination of Sheep and Goats. Butterworths, Wellington, pp. 122–141.

Ezekwe A, 1988a. « Ejaculate characteristic of two breeds of tropical bulls N'dama and Muturu » Joint seminar on animal of African countries, Addis-Ababa.

Fabrice, Benoit ,Guillaume Rigal 2008 .Comparaison de la qualité de la semence de taureaux collectés à l'électro-éjaculateur ou au vagin artificiel(Doctoral dissertation).

Fatet A, Leboeuf B, Freret S, Druart X, Bodin L, Caillat H, David I, Palhière I, Boué P et Lagriffoul G 2008 L'insémination dans les filières ovines et caprines. *Renc. Rech. Ruminants.* 15, 355–358. Freitas V J.

Fernandez –Abella D., Preve M. O. et Villegas N., 2003. Insemination time and dilution rate of cooled and chilled ram semen affects fertility. *Theriogenology*, **60**: 21-26.

Footer, H., 2003. Fertility estimation :a review of past experience and future prospects. *Anim. Reprod. Sci.*, **75**: 119-139.

Fougner J.A., 1974. Intrauterin inseminasjon med dypfrossen saed hos geit. Proc. 12th Nord Vet. Cong. Reyhjavik. DII3, 147-148.

Foulkes, J A, Sweasey, D & Goodey, R G 1980 Fertility of bull spermatozoa in egg-yolk diluents of varied lipid fatty acid composition. *J Reprod Fertil* **60** 165-9.

Fukuhara, R., Nishikawa, Y., 1973. Effects of pH, sperm concentration, washing and substrate concentration on respiration and motility of goat spermatozoa. *Jpn. J. Zootech. Sci.* **44**, 266–270.

Gadea, J 2003 Semen extenders used in the artificial insemination of swine. *Span J Agric Res* **1** 17- 27.

Gahery C., 2012. La reproduction des caprins : maîtrise et mise en oeuvre dans les élevages - Réalisation d'un recueil sur support DVD. Thèse de doctorat vétérinaire, Faculté de médecine, Nantes. Oniris : Ecole Nationale Vétérinaire, Agroalimentaire et de L'alimentation Nantes Atlantique, 246 p.

Garcia-Ispuerto I., 2007. Factors affecting the fertility of high producing dairy herds in northeastern Spain. *Theriogenology*, **67**:632-638.

Girod C, Czyba J-C 1977. «Biologie de la reproduction». Simep édition, 356p, p11-120.

Gomes W.R, 1977. «Artificial insemination». Extrait de Cole H.H. « Reproduction in domestic animals». 3^{ème} édition, 257-261.

GONZALEZ-RECIO O., CHANG Y. M., GIANOLA D. et WEIGEL K. A., 2005. Number of inseminations to conception in Holstein cows using censored records and time depend entcovariates. *J. Dairy Sci.*, **88**: 3655-3662.

Good, N.E., Winget, G.D., Winter, W., Connolly, T.N., Izawa, S., Singh, R.M.M., 1966. Hydrogen ion buffers for biological research. *Biochemistry* **5**, 467–477.

Goyal, H., Memon, M.A., 2006. Chapitre 64 - Clinical reproductive anatomy and physiology of the buck., in : Current Therapy in Large Animal Theriogenology Vol.2. Saunders 511-513
24 42- 52.

Graham, E.F., Crabo, B.G., Brown, K.I., 1972. Effect of some zwitterion buffers on the freezing and storage of spermatozoa I. *Bull. J. Dairy Sci.* **55**, 372–378.

Gravance, C.G., White, C., Robertson, K.R., Champion, Z.J., Casey, P.J., 1997. The effects of cryopreservation on the morphometric dimensions of caprine sperm heads. *Anim. Reprod. Sci.* 49,

Grimard B., Freret S., Chevallier A., Pinto A. et Ponstart C., 2006. Genetic and environmental factors influencing first service conception rate and late embryonic/foetal mortality in low fertility dairy herds. *Anim. Reprod. Sci.*, **91**: 31-44.

Guerin Y., Locatelli Y., Comizolli P., Mauguet R., Mermillod P., et al., 2003. Conservation et utilisation du sperme epididymaire d'ovins et de cervidés en insémination artificielle et fécondation in vitro. *Les actes du BRG 4* : 173-183.

Hafez E.S.E, 1987. « Reproduction in farm animals » 1 vol. Leo-Febriger, 5ème éd., 633p.

Hanzen C 2006. «Propédeutique de l'appareil reproducteur mâle et examen du sperme des ruminants, équidés et porc». Cours de reproduction, université de Liège, Belgique.

Hanzen L'insémination artificielle chez les ruminants 2016 Université de Liège Faculté de Médecine Vétérinaire Service de Thériogenologie des animaux de production.

Hanzen L'insémination artificielle chez les ruminants 2016 Université de Liège Faculté de Médecine Vétérinaire Service de Thériogenologie des animaux de production.

Hanzen, 2008. Insémination Artificielle chez les ruminants. *Ann. Méd. Vét.*, **135**:481-487.

Haskouri , 2001. Insémination artificielle et détection des chaleurs chez la vache, 11p.

Haye A, M'betiegue C, Nazair LG, Tanon B, 2004. Evaluation de la qualité du sperme du belier de race Djallonké en région de savane humide de Côte d'Ivoire. *Agronomie africaine* 16: 37-46.

Holt, W.V., 2000. Basic aspects of frozen storage of semen. *Anim. Reprod. Sci.* 62, 3–22.

Holt, W.V., 2000. Basic aspects of frozen storage of semen. *Anim. Reprod. Sci.* 62, 3–22.

Ijaz, A., Hunter, A.G., Graham, E.F., 1989. Identification of the capacitation agent for bovine sperm in egg yolk-TEST semen extender. *J. Dairy Sci.* 72, 2700–2706.

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, 1961. Studies on the egg yolk coagulating factors in goat semen: II properties of the coagulating factor and influential conditions for coagulation. In: Proceedings of Silver Jubilee Laboratory of Animal Husbandry, Kyoto University, pp. 97–104.

Iritani, A., Nishikawa, 1963. Studies on the egg-coagulating enzyme in goat semen; IV. On the position of yolk constituents attacked by the coagulating enzyme. *Jpn. J. Anim. Reprod.* 8, 113– 117.

Iritani, A., Nishikawa, Fukuhara, R., 1964. Studies on the egg yolk coagulating factor in goat sperm: I. Localization of coagulating factors and decline of pH following coagulating. In: Proceedings of Silver Jubilee Laboratory of Animal Husbandry, Kyoto University, pp. 97–104.

Jaiswal, B.S., Majumder, G.C., 1998. Biochemical parameters regulating forward motility initiation in vitro in goat immature epididymal spermatozoa. *Reprod. Fert. Dev.* 10, 299–307.

Jeulin C, Lewin L . M, 1996. « Role of free carnitine and acetyl-L- carnitine in post-gonadal maturation of mammalian spermatozoa ». *Hum ,Reprod ,Uptake ,2,87-102.*

Kaabi M., Alvarez M., ANEL E., Chamorro C. A. et Boixon J. C., 2006. Influence of breed and age on morphometry and depth of inseminating catheter penetration in the ewe cervix: a post mortem study. *Theriogenology*, **66**:1876-1883.

KAABI M., ALVAREZ M., ANEL E., CHAMORRO C. A. et BOIXO J. C., 2006. Influence of breed and age on morphometry and depth of inseminating catheter penetration in the ewe cervix: a post mortem study. *Theriogenology*, **66**:1876-1883.

Karatzas, G., Karagiannidis, A., Varsakeli, S., Brikas, 1997. Fertility of fresh and frozen-thawed goat semen during the nonbreeding season. *Theriogenology* 48, 1049–1059.

Katila, T 1997 Procedures for handling fresh stallion semen. *Theriogenology* 48 1217-27.

Katz, L.S., McDonald, T.J., 1992. Sexual behavior of farm animals. *Theriogenology* 38, 239–253.

Keskintepe, L., Simplicio, A.A., Brackett, B.G., 1998. Caprine blastocyst development after in vitro fertilization with spermatozoa frozen in different extenders. *Theriogenology* 49, 1265– 1274.

Knox R V, 2016. Artificial insemination in pigs today. *Theriogenology* 85: 83-93.

- Kundu, C.N., Chakraborty, J., Dutta, P., Bhattacharyya, D., Ghosh, A., Majumder, G.C., 2000.** Development of a simple sperm cryopreservation model using a chemically defined medium and goat cauda epididymal spermatozoa. *Cryobiology* 40, 117–125.
- Kundu, C.N., Chakraborty, J., Dutta, P., Bhattacharyya, D., Ghosh, A., Majumder, G.C., 2002.** Effect of dextrans on cryopreservation of goat cauda epididymal spermatozoa using a chemically defined medium. *Reproduction* 123, 907–913.
- Kundu, C.N., Das, K., Majumder, G.C., 2001.** Effect of amino acids on goat cauda epididymal sperm cryopreservation using a chemically defined model system. *Cryobiology* 41, 21–27.
- Leboeuf B, Restall B, Salamon S, 2003.** «Production et conservation de la semence de bouc pour l'insémination artificielle ». *INRA Prod. Anim.*, 16 (2), 91-99.
- Leboeuf, B., Manfredi, E., Boue, P., Piacere, A., Brice, G., Baril, G., Broqua, C., Humblot, P., Terqui, M., 1998.** Artificial insemination of dairy goats in France. *Livest. Prod. Sci.* 55, 193–202.
- Leboeuf, B., Restall, B., Salamon, S., 2000.** Production and storage of goat semen for artificial insemination. *Anim. Reprod. Sci.* 62, 113–141.
- Leborgne M-C, Tanguy J-M, Foisseau J-M, Selin I, Vergonzanne G, Wimmer E 2013.** *Reproduction des animaux d'élevage*. Edicagri (Editeur), 3ème édition, Paris, 466pp.
- Liu, Z., Foote, R.H., Brockett, C.C., 1998.** Survival of bull sperm frozen at different rates in media varying in osmolarity. *Cryobiology* 37, 219–230.
- Mann, T., 1954.** *The Biochemistry of Semen*. Methuen and Co. Ltd., London, 240 pp.
- Marquis P-H, 1990.** « Synchronisation de l'oestrus et insémination artificielle dans l'espèce caprine ». *Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse*. Thèse pour le doctorat vétérinaire, diplôme d'état. 156p.
- Maxwell W.M.C, Evans G, 1987.** « Salamon's artificial insemination of sheep and goats ». Butterworths, Sydney, Australia, 102p.
- Mazur, P 1984** Freezing of living cells: mechanisms and implications. *Am J Physiol* 247 C125 42.

Mc. Donald Me, 1980. « Veterinary endocrinology and reproduction ». Lea et Febiger edition 3rd 560 p.

McArthur C.P. et Gearay A., 1986. Field evaluation of a pregnancyimmunoassay for the detection of oestronesulphate in goats. *J. Endocrinol.*, **110**:133-136.

Melendez P. et Pinedo P., 2007. The association between reproductive performance and milkyield in Chileanholsteincattle. *J. DairySci.*, **90**: 184-192.

Memon, M.A., Bretzlaff, K.N., Ott, R.S., 1985. Effect of washing on motility and acrosome morphology of frozen-thawed goat spermatozoa. *Am. J. Vet. Res.* 46, 473–475.

Molinia, F.C., Evans, G., Casares, P.I., Maxwell, W.M.C., 1994a. Effect of monosaccharides and disaccharides in Tris-based diluents on motility, acrosome integrity and fertility of pellet frozen ram spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.* 36, 113–122.

Molinia, F.C., Evans, G., Maxwell, W.M.C., 1994b. In vitro evaluation of zwitterion buffers in diluents for freezing ram spermatozoa. *Reprod. Nutr. Dev.* 34, 491–500.

Molinia, F.C., Evans, G., Maxwell, W.M.C., 1996. Fertility of ram spermatozoa pellet-frozen in zwitterion-buffered diluents. *Reprod. Nutr. Dev.* 36, 21–29.

Moussa, M, Marinet, V, Trimeche, A, Tainturier, D & Anton, M 2002 Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen. *Theriogenology* 57 1695- 706.

Nadarajah K., Burnside E. B. et Schaeffer L. R., 1988. Geneticparameters for fertility of dairy bulls. *J. DairySci.*, **71**: 2730-2734.

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

Nunes, J.F., Corteel, J.M., Combarous, Y., Baril, G., 1982. Role du plasma seminal dans la survie in vitro des spermatozoides de bouc. *Reprod. Nutr. Dev.* 22, 611–620. '

Ortavant R., 1977. «Photoperiodic regulation of reproduction in the sheep». In: Management of reproduction in sheep and goats symposium». Madison , 25-25, July, 58-71.

O'Shea, T & Wales, R G 1966 Effect of casein, lecithin, glycerol, and storage at 5 degrees C on diluted ram and bull semen. *Aust J Biol Sci* 19 871 -82.

Oyeyemi MO, Akusu MO, Adeniji DA, 2012. Comparative responses of West African dwarf goats to three estrus synchronizing agents. *Israel Journal of Veterinary Medicine* 67: 48-54.

Pace, M M & Graham, E F 1974 Components in egg yolk which protect bovine spermatozoa during freezing. *J Anim Sci* 39 1144-9.

Parez M.1983 Thibier M. Union Nationale des Cooperatives d' Elevage et d' Insemination Artificielle, Maisons-Alfort (France). Services Techniques [Corporate Author.

Pellicer M.T., 1995. Purificacion y caracterizacion del componente de la secrecion bulbouretral de macho cabrio implicado en el deterioro de la calida de los espermatozoides 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.

Pellicer-Rubio, 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. *Reproduction*, 112(1), 95-105.

Pellicer-Rubio, 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.

Pellicer-Rubio, M.T., Magallon, T., Combarous, Y., 1997. Deterioration of goat sperm viability in milk extenders is due to a bulbourethral 60-kilodalton glycoprotein with triglyceride lipase activity. *Biol. Reprod.* 57, 1023–1031.

photoperiodic cycles on male genital tract and testicular parameters in male goats (*Capra hircus*). *Reproduction, Nutrition, Development* 35, 549–558.

Piles, M., O. Rafel, J. Ramon, et L. Varona. 2005. Genetic parameters of fertility in two lines of rabbits with different reproductive potential. *J. Anim. Sci.*, **83(2)**:340-343.

Piles, M., O. Rafel, J. Ramon, et L. Varona. 2005. Genetic parameters of fertility in two lines of rabbits with different reproductive potential. *J. Anim. Sci.*, **83(2)**:340-343.

Prins, G.S., 1999. Semen. In: Knobil, E., Neill, J.D. (Eds.), *Encyclopedia of Reproduction*, vol. 4. Academic Press, San Diego, pp.-360–367.

Pryce J. E. et Harris B. L., 2006. Genetics of Body Condition Score in New Zealand Dairy Cows. *J. Dairy Sci.*, **89**: 4424-4432.

Reproduction chez les animaux domestiques.- Louvain-la neuve: Cabay.- 1141 p.

Restall B., 2003. Production et conservation de la semence de bouc pour l'insémination artificielle. *INRA Prod. Anim.*, **16** (2) : 91-99.

Restall B., 2003. Production et conservation de la semence de bouc pour l'insémination artificielle. *INRA Prod. Anim.*, **16** (2) : 91-99.

Ritar, A.J., 1993. Control of ovulation, storage of semen, and artificial *insemination* of fibre-producing goats in Australia: a review. *Aust. J. Exp. Agr.* **33**, 807–820.

Ritar, A.J., Ball, P.D., O'May, P.J., 1990a. Artificial insemination of Cashmere goats: effects on fertility and fecundity of intravaginal treatment, method and time of insemination, semen freezing process, number of motile spermatozoa and age of females. *Reprod. Fertil. Dev.* **2**, 377–384.

Ritar, A.J., Ball, P.D., O'May, P.J., 1990a. Artificial insemination of Cashmere goats: effects on fertility and fecundity of intravaginal treatment, method and time of insemination, semen freezing process, number of motile spermatozoa and age of females. *Reprod. Fertil. Dev.* **2**, 377–384.

Ritar, A.J., Ball, P.D., O'May, P.J., 1990b. Examination of methods for the deep freezing of goat semen. *Reprod. Fertil. Dev.* **2**, 27–34.

Ritar, A.J., Ball, P.D., O'May, P.J., 1990b. Examination of methods for the deep freezing of goat semen. *Reprod. Fertil. Dev.* **2**, 27–34.

Ritar, A.J., Mendoza, G., Salamon, S., White, . Ritar, I.G., 1992. Frequent Semen Collection and Sperm Reserves of the Male Angora Goat (*Capra Hircus*). *J Reprod Fertil* **95**, 97–102.

Ritar, A.J., Salamon, S., 1982. Effects of seminal plasma and of 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.

Roche J. R., 2007. Associations among body condition score, body weight, and reproductive performance in seasonal-calving dairy cattle. *J. Dairy Sci.*, **90**, 376-391.

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

Roy, A., 1957. Egg yolk coagulating enzyme in the semen and Cowper's gland of the goat. *Nature* 179, 318–319.

Salamon S, 1976. « Artificial insemination in sheep » Anima 1 husbandary department university of Sydney, 139p.

Salamon S. et Maxwell W. M. C., 2000. Storage of ram semen. *Anim. Reprod. Sci.*, **62**: 77-111.

Salamon, S & Maxwell, M C 1995 Frozen storage of ram semen. II. Causes of low fertility after cervical insemination and methods of improvement. *Anim Reprod Sci* 38 1 -36.

Salamon, S & Maxwell, M C 2000 Storage of ram semen. *Anim Reprod Sci* 62 77-111.

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.

Salvador I. V.-D.-C., MP; Bernacer, J; Gomez, EA; et Silvestre, MA, 2005. Factors affecting pregnancy rate in artificial insemination with frozen semen during non-breeding season in Murciano-Granadino goats: A field assay. *Reprod. Domest. Anim.*, **40**: 526-529.

Sawyer, D.E., Brown, D.B., 1995. The use of an in vitro sperm activation assay to detect chemically induced damage of human sperm nuclei. *Reprod. Toxicol.* 9, 351–357.

Setchell B.P, Maddocks S, Brooks D.E, 1994. « Anatomy, vasculature, innervation and fluids of reproductive male tract ». In « The physiology of reproduction ». Second edition, Knobil E, Neil J.D, coord., Raven press Ltd, NY, 1063-1175.

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 AixMarseille II.

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

Soltner D, 1993. « Zootechnie générale, tome 1., la reproduction des animaux d'élevage ». Edition INRA, science et technique agricole.

Stievenart, M. – L'électro-éjaculation chez les mammifères. Revue bibliographique Th. : Med.vet. : Lyon : 1997, n°6609.

Thibault C, 1975. «La fécondation». 1 vol. Masson (1995). 20.

Thibault C, Levasseur M-C, 2001. « La reproduction chez les mammifères et l'homme ». INRA, Editions Ellipses.

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 zwitterions buffers on the freezability of Boer goat semen. *Theriogenology* 37, 947–951.

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.

Upreti, G.C., Hall, E.L., Koppens, D., Oliver, J.E., Vishwanath, R., 1999. Studies on the measurement of phospholipase A2 (PLA2) and PLA2 inhibitor activities in ram semen. *Anim. Reprod. Sci.* 56, 107–121.

Vaissaire J-P., 1977. “Sexualité et reproduction des mammifères domestiques et de laboratoires”. MALOINE S.A. ÉDITEUR. 457p.p81-155.

Varona L. et Norguera J. L., 2001. Variance components of fertility in Spanish Landracepigs. *Livest. Prod. Sci.*, 67: 217-221.

Visconti, P.E., Kopf, G.S., 1998. regulation of protein phosphorylation during sperm capacitation. *Biol. Reprod.* 59, 1–6.

Vishwanath, R & Shannon, P 2000 Storage of bovine semen in liquid and frozen state. *Anim Reprod Sci* 62 23-53.

Hammerstedt, R H, Graham, J K & Nolan, J P 1990 Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. *J Androl* 11 73-88.

Walkden Brown 1994. Daily sperm output, extra-gonadal sperm reserve, daily sperm production rate and seminiferous tubule length, 78p.

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