

GENEVIÈVE MAHER

**COMPARAISON DES TECHNIQUES DE
CRYOCONSERVATION DE LA SEMENCE
CHEZ LE BOUC ET D'INSÉMINATION
ARTIFICIELLE CHEZ LA CHÈVRE**

Mémoire présenté
à la Faculté des études supérieures et postdoctorales de l'Université Laval
dans le cadre du programme de maîtrise en sciences animales
pour l'obtention du grade de Maître ès sciences (M. Sc.)

DÉPARTEMENT DES SCIENCES ANIMALES
FACULTÉ D'AGRICULTURE DE L'ALIMENTATION ET DE LA CONSOMMATION
UNIVERSITÉ LAVAL
QUÉBEC

2012

© Geneviève Maher, 2012

Résumé

Ce mémoire compare, dans un premier temps, les impacts de deux protocoles de congélation de la semence de bouc (diluants à base de jaune d'œuf ou de lait) sur la qualité de la semence décongelée ainsi que sur son pouvoir fécondant. Pour ce faire, les semences de sept boucs de race Alpine, soumis à une photopériode alternant les jours courts (JC) et les jours longs (JL) toutes les six semaines, ont été récoltées 2 à 3 fois par semaine pendant 12 mois. Chaque éjaculat récolté a été analysé (volume, concentration, viabilité, intégrité de l'acrosome), divisé et congelé selon les deux protocoles de cryoconservation. La semence a été analysée de 0 à 5 h après sa décongélation. Afin de comparer l'impact du protocole de congélation sur le pouvoir fécondant de la semence, une série d'inséminations artificielles (IA) intra cervicales a été réalisée sur des chèvres en chaleurs synchronisées.

Dans un deuxième temps, ce mémoire évalue l'efficacité des IA réalisées sur les chèvres en chaleurs synchronisées et sur les chèvres en chaleurs naturelles. Dans un troisième temps, ce mémoire documente l'influence d'une photopériode de 6 semaines sur l'activité sexuelle et sur la qualité de la semence (fraîche et décongelée) des boucs québécois.

Les résultats ont démontré une tendance favorable au diluant à base de lait. La fertilité de la semence congelée dans le lait est supérieure à la semence congelée dans le jaune d'œuf ($P = 0,067$). La qualité de la semence congelée permet d'expliquer les taux de fertilité obtenus. La semence congelée dans le lait montre une meilleure motilité, viabilité, intégrité de l'acrosome et activité des mitochondries à différents temps entre 0 et 5 h après décongélation. Ainsi, le protocole de congélation à base de lait permet une meilleure conservation de la qualité de semence des boucs que le protocole à base de jaune d'œuf. Une grande variabilité de fertilité entre les mâles a également été observée.

Les IA des chèvres en chaleurs naturelles et synchronisées ont permis des fertilités équivalentes. De plus, la photopériode de 6 semaines de JC et 6 semaines de JL a permis de récolter et congeler la semence de bouc tout au long de l'année.

Ce travail a permis l'approfondissement des connaissances en lien avec les procédés de congélation de la semence des boucs québécois, de synchronisation des chaleurs et d'IA chez la chèvre.

Abstract

This work compares the impact of two buck semen freezing processes (egg yolk or milk-based diluents) not only on thawed semen quality, but also on fertility rate following artificial inseminations. Semen of seven Alpine bucks, housed under alternative photoperiods of long days and short days every 6 weeks, were collected 2 or 3 times a week for 12 months. Each ejaculate was analysed (volume, concentration, viability and acrosome integrity), divided and frozen in both freezing processes. Semen was analysed 0 to 5 hours after thawing. To compare the impact of freezing process on fertility, artificial inseminations were realised on a group of oestrus synchronised goats.

This work also evaluates the efficiency of artificial insemination on goat after synchronised or natural oestrus detection. Finally, this work documents the influence of alternative 6 weeks photoperiod on sexual activities and on Quebec Alpine buck semen quality (fresh and thawed).

Results showed a favorable tendency of milk-based diluent. Fertility rate of semen frozen in milk process was superior than in egg yolk process ($P = 0.067$). Post-thawed semen quality explains these fertility results. Milk-based thawed semen shows higher motility, viability, acrosome integrity and mitochondria activity at different times between 0 and 5 hours post-thaw. Thus, milk-based freezing process permitted better preservation of semen quality compared to egg yolk-based freezing process. Large variability of fertility between bucks has also been observed.

Moreover, fertility rate following artificial inseminations on goats with natural or synchronised oestrus permitted equivalent results. Finally, the use of 6 weeks photoperiod cycles allowed buck semen collections all year long.

This work has increased knowledge related to Quebec buck semen freezing process, oestrus synchronisation and artificial inseminations of goats.

Avant-Propos

Merci à ma directrice de recherche, Janice Bailey, d'avoir sélectionné et soutenu ma candidature pour ce projet de maîtrise. J'aimerais souligner le support essentiel de son équipe de recherche du Laboratoire de Fonction Spermatique de l'Université Laval.

Merci aux professeurs François Castonguay et Dany Cinq-Mars pour leur temps, leurs judicieux conseils, mais surtout pour m'avoir transmis leur passion pour les sciences animales.

J'aimerais remercier le personnel de la chèvrerie au CRSAD : Paul Montambault, pour son hospitalité, sa bonne humeur et ses disponibilités, même à des heures tardives, pour les expériences à la ferme. Hélène Lavallée et Étienne Grenier pour leur dévouement au projet de récolte, le travail avec les boucs nécessitant beaucoup de patience et de minutie. Enfin, je ne puis passer sous silence le superbe travail de Julie Bernier dans l'entraînement des boucs à la récolte.

Un immense merci à Mireille Thériault pour son aide généreuse et indispensable dans l'analyse statistique de mes résultats.

Merci au Centre de recherche en biologie de la reproduction ainsi qu'au Réseau Québécois en reproduction qui m'ont donné accès à de nombreuses activités formatrices et enrichissantes.

Je remercie le Conseil pour le développement de l'agriculture du Québec (CDAQ) pour sa contribution financière au projet et son implication dans la recherche en agriculture.

Merci à ma famille d'avoir encouragé la poursuite de mes études malgré la relation à distance que cela impliquait.

Merci Louis-Pierre, mon amoureux, mon complice.

Table des matières

Résumé.....	ii
Abstract.....	iv
Avant-Propos.....	v
Table des matières.....	vi
Liste des tableaux.....	ix
Liste des figures.....	xi
Introduction.....	12
Chapitre 1 : Revue des travaux antérieurs.....	13
1.1 Mise en contexte.....	13
1.2 Saisonnalité, traitements photopériodiques et production de semence.....	14
1.2.1 Libido et taille testiculaire.....	16
1.2.2 Volume et concentration de la semence.....	18
1.2.3 Motilité et viabilité.....	20
1.2.4 Qualité de la semence décongelée.....	22
1.2.5 Fertilité de la semence.....	24
1.3 Glandes annexes et liquide séminal.....	25
1.3.1 Rôles et propriétés des glandes annexes chez le bouc.....	25
1.3.2 Caractérisation des composantes du plasma séminal chez le bouc.....	25
1.3.2.1 Définition du plasma séminal.....	25
1.3.2.2 Composition.....	26
1.3.2.3 Enzyme EYCE.....	26
1.3.2.4 BUSpg60.....	27
1.3.2.5 Protéines d'affinité à l'héparine.....	28
1.4 Congélation de la semence.....	29
1.4.1 Principes de congélation des cellules.....	29
1.4.1.1 Chocs thermiques.....	30
1.4.1.2 Cristallisation.....	30
1.4.1.3 Stress osmotique.....	31
1.4.2 Procédés de congélation de la semence.....	31
1.4.2.1 Récolte de la semence.....	32
1.4.2.2 Dilution de la semence dans un diluant.....	32
1.4.2.3 Méthode sans plasma séminal.....	36
1.4.2.4 Méthode avec plasma séminal.....	38
1.4.2.5 Refroidissement et ajout de glycérol.....	38
1.4.2.6 Congélation.....	39
1.4.2.7 Entreposage (durée de vie dans l'azote liquide).....	42
1.4.2.8 Décongélation.....	43
1.5 Capacitation et hyperactivation.....	44
1.5.1 Spécificité du tractus femelle relatif à la capacitation.....	45
1.5.2 Capacitation et changements du spermatozoïde.....	45
1.5.3 Cryocapacitation et agents décapacitants.....	46
1.5.4 Protocole de lecture des spermatozoïdes avec colorant CTC.....	47
1.6 Réaction de l'acrosome.....	48
1.6.1 Structure de l'acrosome.....	48

1.6.2	Réaction spontanée de l'acrosome.....	49
1.7	Hypothèses générales de la recherche du présent mémoire.....	50
1.8	Objectifs.....	51
	Bibliographie.....	52
	Chapitre 2 : Comparaison de deux techniques de cryoconservation de la semence de boucs, basée sur la qualité après décongélation et sur la fertilité.....	60
2.1	Résumé.....	60
2.2	Abstract.....	61
2.3	Introduction.....	62
2.4	Material and methods.....	63
2.4.1	Chemicals.....	63
2.4.2	Animals.....	64
2.4.3	Semen collection and evaluation.....	64
2.4.4	Semen dilution.....	65
2.4.4.1	Egg yolk-based protocol.....	65
2.4.4.2	Milk-based protocol.....	65
2.4.5	Freezing and thawing of semen.....	66
2.4.5.1	Post-thawing analysis.....	66
2.4.6	Artificial insemination.....	67
2.5	Experimental design.....	68
2.6	Statistical analyses.....	69
2.7	Results.....	70
2.7.1	Experiment 1: Post-thaw sperm quality of semen cryopreserved using the egg yolk-based versus milk-based protocols.....	70
2.7.2	Experiment 2: Fertility following cervical insemination with semen cryopreserved using the egg yolk-based versus milk-based protocols.....	74
2.7.2.1	Semen used for artificial insemination.....	74
2.7.2.2	Fertility.....	77
2.8	Discussion.....	79
2.8.1	How might the differences between the two cryopreservation protocols influence semen quality?.....	80
2.8.2	Impact of semen cryopreservation protocol on fertility.....	82
2.9	Conclusions.....	82
	Bibliography.....	84
	Chapitre 3 : Impact de la synchronisation des chaleurs sur la fertilité des chèvres inséminées avec de la semence congelée dans un diluant à base de lait.....	88
3.1	Résumé.....	88
3.2	Introduction.....	88
3.3	Matériels et méthodes.....	90
3.3.1	Animaux.....	90
3.3.2	Récolte et analyses de la semence fraîche.....	90
3.3.3	Congélation de la semence.....	91
3.3.3.1	Dilution de la semence.....	92
3.3.3.2	Processus de congélation.....	92
3.3.4	Décongélation et analyses de la semence.....	92
3.3.4.1	Cytomètre en flux.....	93
3.3.5	Tests de fertilité.....	93

3.3.5.1	Synchronisation et détection des chaleurs	94
3.3.5.2	Inséminations artificielles	95
3.4	Analyses statistiques	95
3.5	Résultats	95
3.5.1	Congélation de la semence	95
3.5.2	Insémination artificielle	96
3.6	Discussion	98
Bibliographie		99
Chapitre 4 : Observation de la qualité de la semence fraîche et congelée ainsi que de la libido des boucs régis sous photopériode de 1,5 mois de cycle pendant 1 an		100
4.1	Introduction	100
4.2	Matériels et méthodes	101
4.2.1	Animaux	101
4.2.2	Évaluation de l'activité sexuelle	101
4.2.2.1	Libido	101
4.2.2.2	Circonférence scrotale	102
4.2.3	Récolte et analyses de la semence fraîche	102
4.2.4	Congélation de la semence	103
4.2.5	Décongélation et analyses de la semence	103
4.2.5.1	Cytomètre en flux	104
4.3	Résultats	104
4.3.1	Activité sexuelle	104
4.3.1.1	Libido	104
4.3.1.2	Circonférence scrotale	104
4.3.2	Qualité de semence	105
4.3.2.1	Semence fraîche	105
4.3.2.2	Semence décongelée	107
4.4	Discussion	108
4.4.1	Processus	109
4.4.2	Conditions naturelles	109
4.5	Conclusions	110
Bibliographie		111
Chapitre 5 : Conclusions générales		113
5.1	Nouvelles découvertes issues de ce travail de maîtrise	113
5.2	Recommandations à l'industrie québécoise	114
5.3	Directions futures	114

Liste des tableaux

Tableau 1.1	Variations des caractéristiques de la de la semence de boucs en conditions NAT selon la saison de reproduction.....	21
Tableau 1.2	Pourcentage de viabilité de la semence avant et après congélation, chez les boucs Bœr, à différentes périodes de l'année.....	24
Tableau 1.3	Concentration moyenne des principales composantes du plasma séminal chez le bouc.	26
Tableau 1.4	Concentrations d'antibiotiques utilisées par différents auteurs dans la préparation de diluant de congélation pour la semence de boucs.....	36
Tableau 1.5	Comparaison de différents protocoles de congélation de la semence avec une machine programmable.....	41
Tableau 1.6	Résumé des impacts causés par le refroidissement cellulaire.....	42
Tableau 1.7	Comparaison de différents protocoles de décongélation de la semence.....	44
Tableau 1.8	Mécanismes d'action de la capacitation des spermatozoïdes <i>in vivo</i>	46
Table 2.1	Characteristics of fresh semen from 7 Alpine bucks ($n = 28$ ejaculates).	71
Table 2.2	Motile characteristics (LS-means) of thawed sperm from the same ejaculates cryopreserved according to either the egg yolk-based or milk-based protocol. The milk-based cryopreservation protocol results in better sperm MS and LHD 0 h after thaw ($n = 28$ ejaculates).	72
Table 2.3	Membrane and mitochondrial characteristics (LS-means) of thawed sperm from the same ejaculates cryopreserved according to either the egg yolk-based or milk-based protocol. The milk-based cryopreservation protocol results in better sperm parameters 3 and 5 h after thaw ($n = 28$ ejaculates).....	73
Table 2.4	Motile characteristics (LS-means) of thawed sperm from the 4 ejaculates of different bucks used for AI, each frozen according to the egg yolk-based and milk-based protocols.....	75
Table 2.5	Membrane and mitochondrial characteristics (LS-means) of thawed sperm from the 4 ejaculates of different bucks used for AI, each frozen according to the egg yolk-based and milk-based protocols.....	76
Table 2.6	Variation factors of AI pregnancy rate with thawed semen in goats.....	78
Table 2.7	Reproductive performances after AI using thawed sperm from 4 ejaculates of different bucks frozen according to the egg yolk-based and milk-based protocols (treatments).	78
Table 2.8	Mean pregnancy and kidding rates of 4 ejaculates from 4 bucks used for IA..	79
Tableau 3.1	Caractéristiques moyennes (\pm écart type) de la semence décongelée utilisée pour les inséminations artificielles.....	96
Tableau 3.2	Caractéristiques de chacun des groupes d'IA.....	97

Tableau 3.3 Relation entre la méthode d'induction des chaleurs et les taux de gestations, de mises-bas ainsi que de la taille des portées des chèvres laitières suite aux inséminations artificielles	97
Tableau 4.1 Calendrier du cycle de photopériode	101
Tableau 4.2 Caractéristiques de la semence fraîche des boucs sous photopériode de 6 semaines de JC et de JL consécutives pendant 1 an ($n = 596$ éjaculats).	107

Liste des figures

- Figure 1.1** - Pourcentage des boucs élevés en conditions naturelles (contrôle□), sous photopériode de 2 mois (■) ou de 4 mois (■) qui n'éjaculent pas lors des tests de libido (Delgadillo *et al.*, 1991). Les hachures montrent les différences significatives entre les traitements et le contrôle (▨ $P \leq 0,01$, ▩ $P \leq 0,05$). 16
- Figure 1.2** - Poids testiculaire de trois groupes de boucs de races Alpine et Saanen soumis à des changements photopériodiques. en conditions naturelles (contrôle□), sous photopériode de 2 mois (■) ou de 4 mois (■) (Delgadillo *et al.*, 1991). Les bandes hachurées montrent les différences significatives entre les traitements et le contrôle (▨ $P \leq 0,01$, ▩ $P \leq 0,05$). 17
- Figure 1.3** - Variation du volume de l'éjaculat chez les boucs de races Alpine et Saanen élevés en conditions naturelles (contrôle□), sous photopériode de 2 mois (■) ou de 4 mois (■) (Delgadillo *et al.*, 1991). Les hachures montrent les différences significatives entre les traitements et le contrôle (▨ $P \leq 0,01$, ▩ $P \leq 0,05$). 19
- Figure 1.4** - Variations mensuelles de la motilité des spermatozoïdes après dilution, refroidissement et dégel chez le bouc alpin (Leboeuf *et al.*, 2003) adapté de Corteel, 1977. 22
- Figure 1.5** - Pourcentage de spermatozoïdes mobiles après décongélation de semences de boucs de races Alpine et Saanen élevés en conditions naturelles contrôle (□), sous photopériode de 2 mois (■) ou de 4 mois (■) (Delgadillo *et al.*, 1991). Les hachures montrent les différences significatives entre les traitements et le contrôle (▨ $P \leq 0,01$, ▩ $P \leq 0,05$). 23
- Figure 1.6** - Effet d'HAP en saison sexuelle (A) et en contre-saison (B) sur la motilité spermatique de la semence incubée dans un diluant de lait avec l'addition de 6 $\mu\text{L}/\text{mL}$ (□), 12 $\mu\text{L}/\text{mL}$ (Δ) ou 24 $\mu\text{L}/\text{mL}$ (∇) d'HAP. Le contrôle (●) n'avait aucun ajout d'HAP. Chaque point présente la moyenne \pm l'écart-type. Toutes les valeurs sont significativement différentes ($P < 0,05$) (La Falci *et al.*, 2002). 29
- Figure 1.7** - Schéma des événements physiques se produisant pendant la congélation d'une cellule (Mazur, 1977)..... 40
- Figure 1.8** - Colorations CTC suite au marquage des spermatozoïdes normale (F), capacité (B), réacté (AR); (Fraser *et al.*, 1995) Adaptée de Bailey *et al.*, 2000. 48
- Figure 2.1** - Motility of sperm after milk- or egg yolk-based cryopreservation protocol ($^{\circ}P < 0.10$; $^{**}P < 0.01$). 71
- Figure 4.1** - Variation du volume, de la concentration spermatique et de la viabilité moyenne des spermatozoïdes de la semence fraîche de boucs tout au long de l'année. Les boucs étaient soumis à une photopériode de 6 semaines de JC suivies de 6 semaines de JL. 106
- Figure 4.2** - Variation de la qualité de la semence de bouc 5 h après décongélation selon la période de congélation. Les boucs étaient soumis à une photopériode de 6 semaines de JC suivies de 6 semaines de JL. 108

Introduction

Au Québec, la production caprine est un secteur en croissance à fort potentiel économique (Gingras et Dumoulin, 2008). L'augmentation de la demande de lait de chèvre s'explique notamment par l'engouement des produits de la chèvre par les consommateurs québécois (principalement le fromage de chèvre). Afin de répondre à cette demande grandissante, l'augmentation de la production laitière du cheptel québécois apparaît une solution envisageable. La France, un leader mondial de l'industrie caprine a démontré que l'amélioration génétique par l'utilisation de l'insémination artificielle (IA) mène à l'augmentation des volumes de production laitière des sujets ainsi qu'à la modification dirigée de la composition du lait (Capgenes, 2004). Cette technique de reproduction permet l'utilisation de génétiques supérieures aux caractéristiques spécifiquement sélectionnées pour chaque production (Capgenes, 2004).

Depuis l'apparition des techniques de cryoconservation de la semence, il y a plus de 50 ans, la compréhension des mécanismes d'actions impliqués dans ce processus de conservation des cellules germinales s'est grandement améliorée, notamment par les nombreuses recherches effectuées sur le modèle bovin. Cependant, relativement peu de recherches ont été menées sur la comparaison des méthodes de congélation de la semence chez le bouc. De plus, ce procédé de congélation des gamètes de boucs n'est pas couramment pratiqué au Québec. La cryoconservation de la semence permet l'accès à une semence de qualité tout au long de l'année, ce qui facilite la pratique de l'IA en contre-saison chez la chèvre. L'apprentissage des techniques de cryoconservation de la semence s'allie aux outils d'amélioration génétique et d'augmentation de la production laitière des troupeaux caprins.

En France, 82 % des IA chez la chèvre sont réalisées à la suite des synchronisations des œstrus par l'utilisation d'hormones exogènes (Ponsart *et al.*, 2004). Peu d'études ont été réalisées sur la pratique d'IA chez les chèvres sans utilisation de traitements hormonaux (Baril *et al.*, 1993; Brice *et al.*, 2002). L'efficacité de cette méthode n'a pas été validée sur les chèvres issues d'élevages québécois. L'intégration des pratiques d'IA chez les chèvres en chaleurs naturelles dans la régie de reproduction des troupeaux, en alternance avec les techniques de synchronisation des chaleurs, permettrait à l'industrie caprine québécoise de promouvoir l'IA comme une technique de reproduction durable.

Chapitre 1 : Revue des travaux antérieurs

1.1 Mise en contexte

Longtemps considérée comme marginale, la production caprine est aujourd'hui un secteur de l'industrie agroalimentaire à fort potentiel économique (Gingras et Dumoulin, 2008). L'intérêt croissant des consommateurs pour les produits de la chèvre s'explique par l'engouement des Québécois pour les produits fins, à leur aspect santé ainsi qu'à la croissance de la population immigrante (Gingras et Dumoulin, 2008). Au Québec, en 2006, la croissance des ventes de fromages de chèvre était évaluée à 5 % par an contre 2 % pour l'ensemble des fromages fins (Morisset *et al.*, 2006).

Cependant, les difficultés du secteur caprin québécois à répondre à la demande grandissante des produits laitiers contraint les transformateurs industriels québécois (responsables de 41,3 % des ventes de fromages) à acheter du lait des autres provinces canadiennes, principalement de l'Ontario. En 2007, 33 % des grands transformateurs étaient dans cette situation et ont importé 23 % de leurs besoins en lait brut (Gingras et Dumoulin, 2008).

La France, un leader mondial de l'industrie caprine a démontré que l'amélioration génétique par l'utilisation de l'insémination artificielle (IA) mène à l'augmentation des volumes de production laitière des sujets ainsi qu'à la modification dirigée de la composition du lait (Capgenes, 2004). Cette situation est également connue chez le bovin laitier où l'effet extrêmement positif de l'IA sur l'amélioration génétique est observable depuis plus de 40 ans. L'IA, à l'aide de semences cryoconservées, constitue donc un outil puissant pour adapter la production laitière caprine à la demande du marché (Leboeuf *et al.*, 1998). De plus, la cryoconservation de la semence permet l'accès à une semence de qualité tout au long de l'année, ce qui facilite la pratique de l'IA en contre-saison chez la chèvre. La conservation à long terme de la génétique d'un animal reproducteur de valeur peut également être réalisée par la cryoconservation. Or, ce procédé de congélation des gamètes de boucs n'est pas couramment pratiqué au Québec, ni en Amérique du Nord. De plus, l'intégrité des spermatozoïdes de boucs suivant la cryoconservation est compromise par les interactions néfastes entre certaines protéines spécifiques du plasma séminal (EYCE, BUSpg60) et les composants des diluants de congélation : la lécithine du jaune d'œuf et les

triglycérides du lait. L'apprentissage des techniques de cryoconservation de la semence s'allie aux outils d'amélioration génétique et d'augmentation de la production laitière des troupeaux caprins laitiers.

1.2 Saisonnalité, traitements photopériodiques et production de semence

La majorité des boucs originaires des latitudes tempérées ($> 40^\circ$) sont des animaux saisonniers dont les fonctions sexuelles sont influencées par les cycles circadiens (Ortavant *et al.*, 1985; Delgadillo *et al.*, 1991; Tuli et Holtz, 1995). On distingue les « jours courts » (JC) des « jours longs » (JL) par la longueur d'ensoleillement des journées. Ainsi, au Québec ($46^\circ 48' -1''$ N, $71^\circ 12' -1''$ E), la période de JC a lieu du mois de septembre au mois de février lorsque l'ensoleillement journalier diminue, et la période de JL se produit de mars à août alors que la durée du jour augmente.

Le cycle sexuel de l'espèce caprine est régi par la sécrétion de mélatonine, un méthoxy-indole synthétisé à partir du tryptophane et de la sérotonine dans la glande pinéale du cerveau, qui traduit l'information photopériodique (Thibault et Levasseur, 2001). Cette hormone est sécrétée uniquement en phase obscure. Les phases nocturnes transmettent un signal par le système nerveux depuis la rétine de l'œil jusqu'à la glande pinéale du cerveau et influencent la sécrétion de mélatonine (Xu, 2001). La variation de sécrétion de mélatonine au cours de l'année déclenche la cyclicité des chèvres et l'activité sexuelle des boucs. En période de JC, l'augmentation de production de la mélatonine stimule la sécrétion pulsatile de la *GnRH* (hormone *gonadoliberine*), qui induit la sécrétion de *FSH* (hormone *folliculostimuline*) et de *LH* (hormone lutéinisante).

La *LH* joue un rôle indispensable dans le démarrage de la spermatogenèse. Sa pulsation contrôle directement la production de testostérone par les cellules de Leydig des testicules. De son côté, la testostérone joue un rôle clé dans le soutien de la spermatogenèse sous l'action de la *FSH*, particulièrement au niveau de la différenciation finale des spermatogonies. La testostérone permet, entre autres, l'apparition et le maintien des caractères sexuels secondaires, telles la pilosité, la croissance musculaire et les pulsions sexuelles. L'étude de Hoffman et son équipe (1992) a mis en évidence les variations de

concentrations plasmiqes en testostérone chez le bouc tout au long de l'année. En période de JL ou de repos sexuel, la production de mélatonine et de *GnRH* diminue, ce qui entraîne une diminution de la *LH*, de la *FSH* et par la suite une diminution de la testostérone. La libido et la production spermatique des boucs sont alors moins favorables à la reproduction (Delgadillo *et al.*, 1991; Karagiannidis *et al.*, 2000). À l'inverse, en période de JC, une concentration plasmiqes élevée en mélatonine accroît les niveaux de *LH*, de *FSH* et de testostérone de l'organisme (Chemineau *et al.*, 1986), ce qui favorise la libido et la production spermatique.

La régulation hormonale des rythmes de reproduction se fait par l'intermédiaire de rétrocontrôles positifs ou négatifs de plusieurs hormones, dont la testostérone, au niveau de l'axe hypothalamus-hypophysaire situé à la base du cerveau (Boissard *et al.*, 2008). La sensibilité à la rétroaction négative de la testostérone est très grande pendant la phase de repos sexuel et faible pendant la phase d'activité sexuelle (Thibault et Levasseur, 2001). Le changement de sensibilité à la testostérone est l'un des mécanismes responsables de la saisonnalité de la reproduction chez le bouc.

La maîtrise du cycle reproducteur chez les animaux saisonniers peut s'effectuer par l'utilisation de traitements photopériodiques artificiels, autrement dit, par le contrôle des phases lumineuses. Cette technique permet notamment d'optimiser les comportements sexuels favorables à la reproduction et la qualité de la semence des boucs (Delgadillo *et al.*, 1995; Pérez et Mateos, 1996; Karagiannidis *et al.*, 2000). Plusieurs types de traitements photopériodiques ont été étudiés par la communauté scientifique. Habituellement, les JC sont définis par 8 h de lumière et les JL par 16 h de lumière. La durée d'un traitement photopériodique inclut les deux cycles lumineux. Ainsi, un traitement photopériodique de 2 mois est défini par un mois de JC suivi d'un mois de JL. Les traitements les plus couramment utilisés pour la récolte des boucs reproducteurs sont de courtes durées allant de 2 à 4 mois. La mise en place de telles régies de photopériodes permet de diminuer l'amplitude de la variation saisonnière de l'activité sexuelle et de la qualité de semence chez le bouc (Delgadillo *et al.*, 1993; Leboeuf *et al.*, 2003). Aucune étude n'a été menée pour évaluer l'impact de ce type de photopériode sur la qualité de la semence des boucs issus d'élevages québécois.

1.2.1 Libido et taille testiculaire

« Chez le mâle adulte, la motivation et l'efficacité sexuelle dépendent à la fois des sécrétions hormonales et des relations sociales entre les animaux. » (Leboeuf *et al.*, 2003). En condition de luminosité naturelle (NAT), l'arrivée des JL diminue fortement l'activité sexuelle des boucs. Au cours de cette période de repos sexuel, le taux d'échec à l'éjaculation suite aux récoltes des boucs à l'aide de vagins artificiels peut grimper jusqu'à 25 % (Delgadillo *et al.*, 1993). L'utilisation d'une photopériode de 4 mois (2 mois de JC suivis de 2 mois de JL) atténue ce comportement de faible libido ou d'échec à l'éjaculation. Lors des tests de libido chez les boucs soumis à cette courte photopériode, le taux d'échec à l'éjaculation varie entre 0 et 5 % tout au long de l'année (Delgadillo *et al.*, 1991, 1993). La figure 1.1 démontre bien ce comportement.

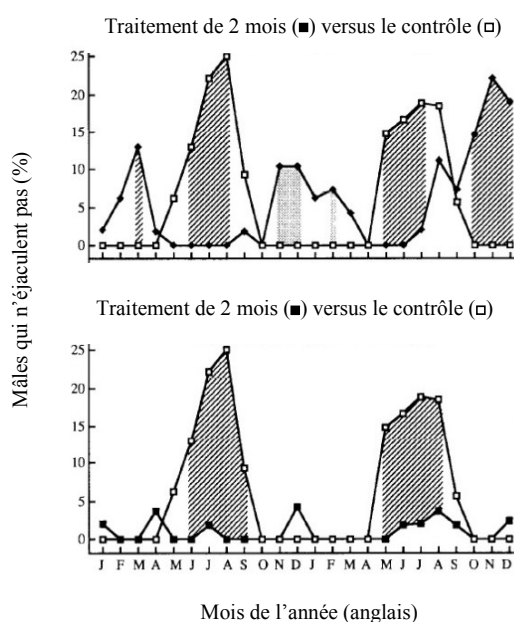


Figure 1.1 - Pourcentage des boucs élevés en conditions naturelles (contrôle□), sous photopériode de 2 mois (■) ou de 4 mois (■) qui n'éjaculent pas lors des tests de libido (Delgadillo *et al.*, 1991). Les hachures montrent les différences significatives entre les traitements et le contrôle (/// $P \leq 0,01$, ■ $P \leq 0,05$).

Afin de déterminer le poids, la palpation des testicules par comparaison à l'aide d'un orchidomètre peut être effectuée. La mesure de la circonférence scrotale peut également être faite à l'aide d'un ruban à mesurer (Walken-Brown *et al.*, 1994). En

conditions NAT, le poids et la taille des testicules sont très variables passant de faible, en saison de repos sexuel, pour atteindre un volume maximal en saison sexuelle (Delgadillo *et al.*, 1991). La taille testiculaire des boucs soumis à des photopériodes de cycles courts (2 à 4 mois) est plus stable, sinon plus élevée que celle observée en saison de reproduction chez les boucs en conditions NAT (Delgadillo *et al.*, 1991, 1993, 1995). Ces variations de la taille testiculaire des boucs sont présentées dans la figure 1.2.

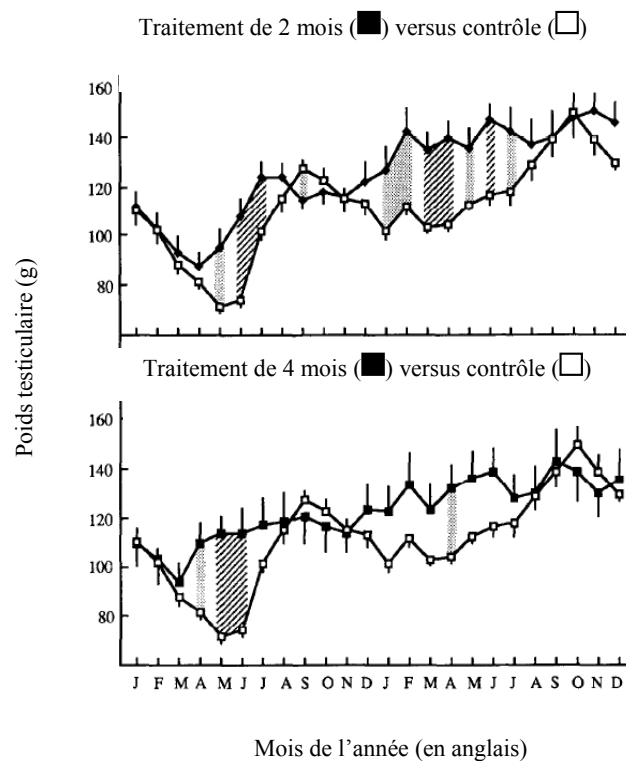


Figure 1.2 - Poids testiculaire de trois groupes de boucs de races Alpine et Saanen soumis à des changements photopériodiques. en conditions naturelles (contrôle □), sous photopériode de 2 mois (■) ou de 4 mois (■) (Delgadillo *et al.*, 1991). Les bandes hachurées montrent les différences significatives entre les traitements et le contrôle (/// $P \leq 0,01$, ■ $P \leq 0,05$).

1.2.2 Volume et concentration de la semence

Tout comme le comportement sexuel, la qualité de la semence est grandement influencée par la photopériode. En conditions NAT, la concentration de la semence varie avec les saisons. Une concentration maximale de la semence est observée avec l'arrivée des JL (de mars à août). Chez les boucs de race Alpine élevés en Grèce (40° 37' -1" N, 22° 58' -1" E) en conditions NAT, la semence atteint une concentration moyenne de $3,77 \times 10^9$ spz/mL en période de JL (Karagiannidis *et al.*, 2000). En période de JC, la concentration moyenne de la semence est de $3,50 \times 10^9$ spz/mL.

Lorsque les boucs sont soumis à une photopériode de 2 ou 4 mois, la concentration et le volume de la semence sont plus stables tout au long de l'année (Delgadillo *et al.*, 1991, 1993; Karagiannidis *et al.*, 2000) comparativement à la semence des boucs en conditions NAT. De plus, le volume moyen de la semence est plus élevé chez les boucs sous photopériode de 2 mois de JC suivis de 2 mois de JL (2,15 mL) et de 4 mois de JC suivis de 4 mois de JL (1,89 mL) que ceux en conditions NAT (1,47 mL) (Delgadillo *et al.*, 1991). La figure 1.3 met en lumière cette variation du volume de la semence des boucs élevés soit en conditions NAT, soit sous photopériode de 2 ou 4 mois.

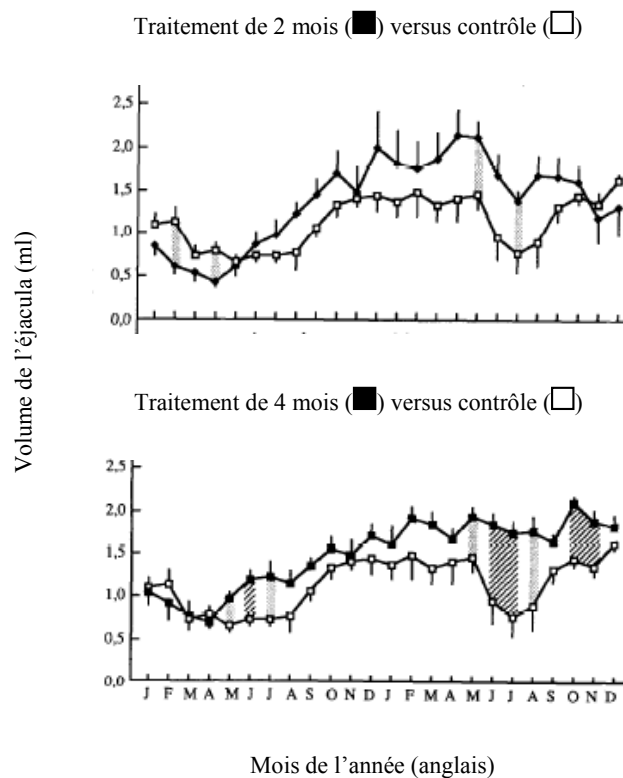


Figure 1.3 - Variation du volume de l'éjaculat chez les boucs de races Alpine et Saanen élevés en conditions naturelles (contrôle □), sous photopériode de 2 mois (■) ou de 4 mois (■) (Delgadillo *et al.*, 1991). Les hachures montrent les différences significatives entre les traitements et le contrôle (▨ $P \leq 0,01$, ▩ $P \leq 0,05$).

L'augmentation du volume et de la concentration de la semence des boucs soumis à une courte photopériode est justifiée par l'activation de la production spermatique. La production moyenne annuelle de spermatozoïdes par éjaculat est de $5,09 \times 10^9$ spz/mL en conditions NAT, de $7,70 \times 10^9$ spz/mL en photopériode de 2 mois de JC suivis de 2 mois de JL et de $7,74 \times 10^9$ spz/mL en photopériode de 4 mois de JC suivis de 4 mois de JL.

Les variations saisonnières influencent donc le volume, la concentration et le nombre total de spermatozoïdes éjaculés. L'usage d'un traitement de courte photopériode permet de maximiser ces paramètres de production de semence tout au long de l'année.

1.2.3 Motilité et viabilité

En conditions NAT, la semence des boucs est sujette à des variations de motilité et de viabilité des spermatozoïdes selon les JC et les JL. Ainsi, la motilité globale et progressive des spermatozoïdes est significativement plus élevée en période de reproduction qu'en contre-saison (Tuli et Holtz, 1995; Karagiannidis *et al.*, 2000). Dans son étude, Karagiannidis a observé une motilité spermatique moyenne de 64 % en JC et de 55 % en JL chez les boucs sous conditions naturelles. La viabilité de la semence suit les mêmes variations saisonnières. Ainsi, la viabilité de la semence est de 76 % en JC et de 64 % en JL (Tuli et Holtz, 1995).

Selon ces auteurs, la hausse de motilité et de viabilité des spermatozoïdes de la semence en période de JC serait causée, entre autres, par un changement de la sécrétion de mélatonine qui augmente les niveaux de *LH* et de testostérone. Le tableau 1.1 met en lumière les variations saisonnières des caractéristiques de la semence de boucs élevés en conditions NAT.

Tableau 1.1 Variations des caractéristiques de la de la semence de boucs en conditions NAT selon la saison de reproduction.Contre-saison ou JL

Études	Race	Latitude	Nombre de spermatozoïdes (10 ⁹)	Volume (mL)	Concentration (10 ⁹ /mL)	Motilité (% spz)	Anomalies (% spz)
Karagiannidis <i>et al.</i> , 2000	Alpine	40°	4,11	1,09	3,77	55,11	11,90
Karatzas <i>et al.</i> , 1997	Alpine	31° à 40°	3,30	0,70	4,60	48,0	-
Pérez et Mateos, 1996	Verata	40°	3,26	0,58	5,76	70,3	17,9
	Malagueña	37°	5,33	1,15	4,74	74,8	5,7

Saison sexuelle ou JC

Études	Race	Latitude	Nombre de spermatozoïdes (10 ⁹)	Volume (mL)	Concentration (10 ⁹ /mL)	Motilité (% spz)	Anomalies (% spz)
Karagiannidis <i>et al.</i> , 2000	Alpine	40°	4,92	1,42	3,50	64,04	8,90
Karatzas <i>et al.</i> , 1997	Alpine	31° à 40°	4,10	1,20	3,40	60,0	-
Pérez et Mateos, 1996	Verata	40°	3,92	1,01	3,86	77,1	7,7
	Malagueña	37°	5,06	1,25	4,12	75,4	4,3

1.2.4 Qualité de la semence décongelée

La congélation de la semence est un stress pour les spermatozoïdes. Pour optimiser la conservation d'un maximum de spermatozoïdes de qualité, plusieurs paramètres doivent être respectés. La saison de reproduction a un impact sur la qualité de la semence éjaculée. Il en va de même pour le potentiel de congélation. Ainsi, les chercheurs ont démontré qu'une semence congelée en saison de reproduction se conserve mieux qu'une autre congelée en contre-saison (Delgadillo *et al.*, 1992; Tuli et Holtz, 1995; Leboeuf *et al.*, 2003).

La figure 1.4 présente la motilité spermatique après dilution, après refroidissement et après dégel à différents moments de l'année chez des boucs en conditions NAT (Leboeuf *et al.*, 2003). On observe que les taux de motilité spermatique les plus faibles concordent avec la période de repos sexuel. En période de reproduction, la motilité de la semence fraîche et décongelée est plus élevée.

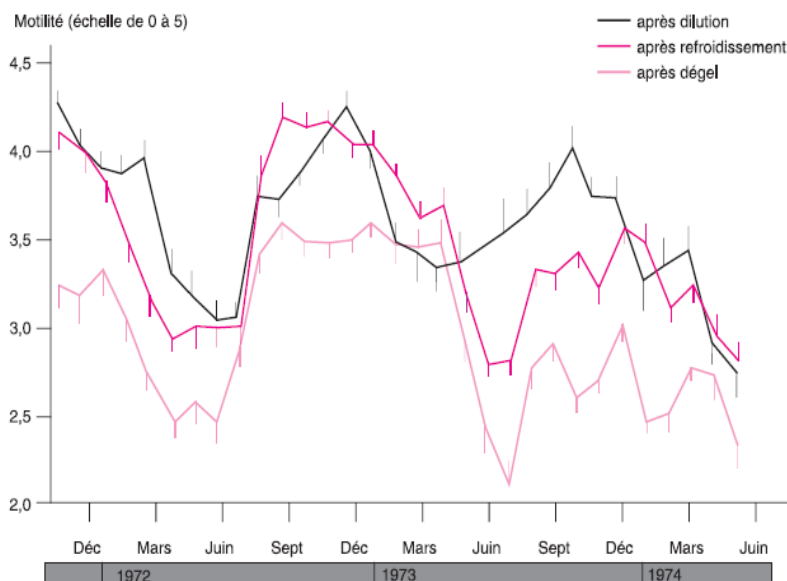


Figure 1.4 - Variations mensuelles de la motilité des spermatozoïdes après dilution, refroidissement et dégel chez le bouc alpin (Leboeuf *et al.*, 2003) adapté de Corteel, 1977.

L'étude de Delgadillo et son équipe (1992) a mis en lumière l'impact des traitements photopériodiques sur la qualité de la semence après décongélation (figure 1.5). En conditions NAT, la motilité spermatique fluctue au rythme des cycles circadiens croissants et décroissants. Dans de telles conditions, la plus faible motilité post-décongélation est observée au mois d'août (à la fin des JL) de la première année et la motilité la plus élevée au mois de janvier (JC) de la deuxième année. Les boucs soumis à des traitements photopériodiques de 2 ou 4 mois de cycle de JC et JL ont une motilité spermatique post-décongélation plus stable comparativement aux boucs élevés en conditions NAT, et ce, pendant les deux années de l'expérience. Ainsi, un traitement photopériodique de courte durée permet de diminuer la perte de motilité spermatique après décongélation. La figure 1.5 présente les variations de motilité de la semence décongelée en fonction du type de photopériode utilisé (2 mois, 4 mois ou en conditions NAT) pendant 2 ans.

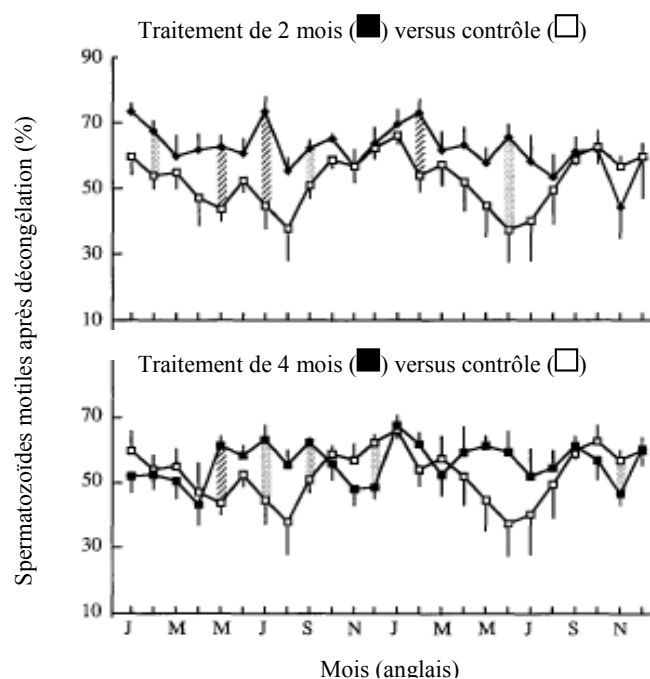


Figure 1.5 - Pourcentage de spermatozoïdes mobiles après décongélation de semences de boucs de races Alpine et Saanen élevés en conditions naturelles contrôle (□), sous photopériode de 2 mois (■) ou de 4 mois (■) (Delgadillo *et al.*, 1991). Les hachures montrent les différences significatives entre les traitements et le contrôle (▨ $P \leq 0,01$, ■ $P \leq 0,05$).

Toujours dans son étude de 1992, Delgadillo et son équipe démontrent les variations de spermatozoïdes anormaux chez les boucs de races Alpine et Saanen selon les photopériodes NAT, de 2 ou 4 mois. Ils concluent qu'une variation du taux de spermatozoïdes anormaux de la semence est observable chez tous les boucs. Cependant, seuls les boucs assignés à des conditions NAT ont démontré une hausse significative du taux d'anormalités (environ 17 %). La moyenne des spermatozoïdes anormaux pour les deux années de l'expérience était de 10,3 %, 5,6 % et 6,4 % respectivement pour les groupes NAT, 2 mois et 4 mois de photopériode.

Chez le bouc Bœr, la viabilité de la semence décongelée est fonction de la période de l'année (Tuli et Holtz, 1995). Tout comme pour la semence fraîche, la viabilité de la congelée en JL (tableau 1.2).

Tableau 1.2 Pourcentage de viabilité de la semence avant et après congélation, chez les boucs Bœr, à différentes périodes de l'année

Pourcentage de spermatozoïdes vivants		
	Avant congélation	Après décongélation
Printemps	61 ^b	32 ^b
Été	71 ^c	40 ^c
Automne	75 ^{cd}	44 ^c
Hiver	76 ^d	49 ^d

Adapté de Tuli et Holtz, 1994. Les moyennes d'une même colonne avec des lettres différentes sont significativement différentes ($P < 0,001$).

1.2.5 Fertilité de la semence

L'impact de la saison de reproduction sur la fertilité de la semence est un sujet controversé. En 1992, Delgadillo et son équipe conclurent que la fertilité de la semence n'était pas affectée par la saison de reproduction. Dans cette étude, la semence de 18 boucs de races Alpine et Saanen réparties en trois groupes selon le type de photopériode (NAT, 2 mois ou 4 mois) a été récoltée et congelée. Les inséminations ont été réalisées sur 1 599 chèvres avec de la semence récoltée et congelée en automne (JC) et au printemps (JL) pour tous les groupes. Aucune différence significative n'a été observée entre les

fertilités suite aux IA. Les taux de gestations moyens pour les 2 races sous photopériode NAT, 2 mois et 4 mois sont respectivement de 62,5 %, 57,9 % et 57,2 %.

De son côté, Corteel et son équipe (1980) ont obtenu des taux de gestations significativement plus faibles ($P < 0,05$) suite aux IA à l'aide de semences congelées en JL (53,0 %) comparativement aux IA réalisées avec des semences congelées en JC (61,0 %).

1.3 Glandes annexes et liquide séminal

1.3.1 Rôles et propriétés des glandes annexes chez le bouc

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 *et al.*, 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 (Boukhlinq, 2002). Les glandes bulbo-urétrales sont toutes petites et situées dans la région caudale de l'urètre (Baril *et al.*, 1993).

1.3.2 Caractérisation des composantes du plasma séminal chez le bouc

1.3.2.1 Définition du plasma séminal

Le plasma séminal est composé des sécrétions de l'épididyme ainsi que de celles des glandes annexes, produites lors de l'éjaculation (Thibault et Levasseur, 2001). Les sécrétions des glandes annexes représentent de 50 à 95 % du plasma séminal (Thibault et Levasseur, 2001). Corteel (1980) définit le plasma séminal comme « *tout ce qui dans l'éjaculat n'est pas spermatozoïdes morts ou vivants* ». Ce fluide joue un rôle important dans la fertilité de la semence, permettant le transport des spermatozoïdes depuis le tractus génital mâle jusqu'à celui de la femelle.

1.3.2.2 Composition

La composition du plasma séminal chez les mammifères varie d'une espèce à l'autre. Corteel et son équipe (1980) ont démontré que certains composés issus de la fraction non épидидymaire de la semence de boucs ont des effets négatifs sur la survie et la motilité des spermatozoïdes. Les principales composantes du plasma séminal de la semence de boucs sont caractérisées dans le tableau 1.3.

Tableau 1.3 Concentration moyenne des principales composantes du plasma séminal chez le bouc.

Composantes	Concentrations moyennes
Riboflavine	Jaune : 5,38 µl/mL
(varie selon la coloration de la semence)	Jaune pâle : 3,09 µl/mL
	Blanc : 1,72 µl/100 mL
Fructose	857 mg/100 mL
Acide citrique	331 mg/10 mL
Acide lactique	73 mg/100 mL
Glucose	6,7 mg/100 mL
Glycérylphosphorylcholine	191 mg/100 mL
L-α-glycérophosphate	3,3 mL/100 mL
Glycérol	1,76 mg/100 mL

Adapté de Mendoza *et al.*, 1989

1.3.2.3 Enzyme EYCE

Le plasma séminal de la semence de boucs est caractérisé par la présence de l'EYCE (« *Egg Yolk Coagulating Enzyme* »). Cette enzyme a été identifiée comme une phospholipase A₂ (PLA₂), sécrétée par les glandes bulbo-urétrales sous influences saisonnières (Iritani *et al.*, 1964; Upreti *et al.*, 1999).

Le jaune d'œuf est fréquemment utilisé comme base de diluant de la semence de boucs lors des procédés de cryoconservation. En contact avec le jaune d'œuf, l'EYCE du plasma séminal hydrolyse des phospholipides de l'œuf et de la membrane

phospholipidique des spermatozoïdes, libérant un acide gras insaturé et un lysophospholipide, la lysolécithine. Ce dernier composé a différentes répercussions sur l'intégrité des spermatozoïdes selon sa concentration dans le plasma séminal, mais également selon le pH du plasma séminal, la température et la saison de production de la semence (Leboeuf *et al.*, 2003). Par conséquent, la concentration en lysolécithine aura différents impacts sur l'intégrité des spermatozoïdes. Une faible concentration en lysolécithine permet l'activation de la motilité (Hartree et Mann, 1961). À des concentrations plus élevées, la lysolécithine peut provoquer la réaction spontanée de l'acrosome (Fleming et Yanagimachi, 1981), la condensation de la chromatine (Sawyer et Brown, 1995) et peut même être toxique pour la survie des spermatozoïdes à de fortes concentrations (Aamdal *et al.*, 1965; Baril *et al.*, 1993; La Falci *et al.*, 2002) provoquant leur mort instantanée (Aamdal *et al.*, 1965).

1.3.2.4 BUSpg60

Les protocoles de cryoconservation de la semence de boucs utilisent également le lait comme base de diluant. L'interaction entre le lait et le plasma séminal produit, de façon similaire au jaune d'œuf, une diminution de la survie des spermatozoïdes (Leboeuf *et al.*, 2003). La BUSpg60, une glycoprotéique de 55-60 kilodaltons, est issue des sécrétions bulbo-urétrales et présente des activités de lipase triglycéride. Démontrant une grande affinité pour l'héparine (La Falci *et al.*, 2002), cette protéine est responsable des effets délétères sur la semence lorsque celle-ci est diluée dans le lait. On rapporte notamment la détérioration de la motilité, de la qualité des mouvements, de l'intégrité de l'acrosome ainsi que la mort cellulaire des spermatozoïdes (Leboeuf *et al.*, 2003).

La BUSpg60 a été caractérisée comme une lipase pancréatique hypothétiquement membre de la famille PLRP₂ (*Pancreatic Lipase Related Proteins 2*) (Pellicer *et al.*, 1997). Elle hydrolyse les triglycérides du lait libérant des acides gras, dont l'acide oléique, un composé toxique pour les spermatozoïdes (Leboeuf *et al.*, 2003). Il semble que la BUSpg60 et l'EYCE soient deux composants analogues (Leboeuf *et al.*, 2003).

1.3.2.5 Protéines d'affinité à l'héparine

Plusieurs protéines du liquide séminal sont impliquées dans la régulation de la réaction de l'acrosome, la régulation du calcium et dans la capacitation des spermatozoïdes (La Falci *et al.*, 2002). Chez le bouc, on retrouve, en faible quantité, des protéines d'affinité à l'héparine (HAP pour « *affinity binding proteins* »). Selon certaines hypothèses de recherches, les HAP agiraient de la même manière que les protéines de liaison à l'héparine présentes dans le plasma séminal de bovin (La Falci *et al.*, 2002). Les protéines de liaison à l'héparine sont responsables de l'enlèvement des phospholipides et du cholestérol de la membrane plasmique des spermatozoïdes (Bergeron et Manjunath, 2006). Lorsque les protéines de liaison à l'héparine du plasma séminal bovin s'attachent à la membrane plasmique des spermatozoïdes, le nombre de sites de liaison à l'héparine augmente. La fixation de l'héparine sur ces sites de liaison enclenche la capacitation des spermatozoïdes (Harshan *et al.*, 2006). Ces mêmes phénomènes seraient causés chez le bouc par les HAP et leurs sécrétions varient selon les cycles de photopériode naturels (La Falci *et al.*, 2002). La figure 1.6 illustre la motilité de la semence épидидymaire de boucs en saison sexuelle et en contre-saison selon la quantité d'HAP ajoutée à la semence. La figure A présente la semence épидидymaire produite en saison sexuelle, additionnée d'HAP produites en saison sexuelle. La figure B présente la semence épидидymaire produite en contre-saison, additionnée de HAP produites en contre-saison. La chute drastique de motilité de la semence (B) suite à l'ajout d'HAP est expliquée par une plus forte activité de la protéine BUSpg60 pendant cette période.

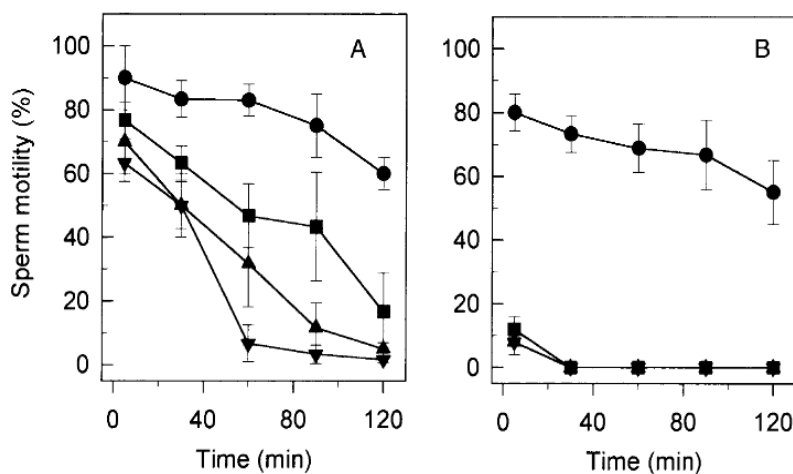


Figure 1.6 - Effet d'HAP en saison sexuelle (A) et en contre-saison (B) sur la motilité spermatique de la semence incubée dans un diluant de lait avec l'addition de 6 $\mu\text{L}/\text{mL}$ (\square), 12 $\mu\text{L}/\text{mL}$ (Δ) ou 24 $\mu\text{L}/\text{mL}$ (∇) d'HAP. Le contrôle (\bullet) n'avait aucun ajout d'HAP. Chaque point présente la moyenne \pm l'écart-type. Toutes les valeurs sont significativement différentes ($P < 0,05$) (La Falci *et al.*, 2002).

1.4 Congélation de la semence

1.4.1 Principes de congélation des cellules

La cryoconservation est définie comme un processus de conservation des cellules à de très basses températures, souvent dans l'azote liquide à -196°C . À cette température, toutes les réactions chimiques, les processus biologiques et les interactions physiques intra et extracellulaires sont figés (Bakhach *et al.*, 2007). Cette méthode de conservation des gamètes mâles facilite la dispersion du bagage génétique d'animaux supérieurs, notamment par l'insémination artificielle. Elle permet également la création de réserves de semences chez les espèces en voie de disparition ou encore la conservation des gènes d'un sujet de valeur.

Les techniques de congélation détériorent la qualité de la semence (Batista *et al.*, 2009). Les stress responsables des dommages causés aux cellules et plus précisément aux spermatozoïdes sont principalement provoqués par les chocs de température, la

crystallisation et les stress osmotiques (Watson, 2000). Les processus de congélation de la semence visent à minimiser la perte de motilité et de viabilité des spermatozoïdes (Dorado *et al.*, 2010).

1.4.1.1 Chocs thermiques

On appelle *chocs thermiques* les changements rapides de température allant essentiellement de 35 à 15°C et de 0 à -80°C (Bakhach *et al.*, 2007). Ces variations de température créent des changements de l'arrangement des constituants lipidiques membranaires et mènent à l'altération des fonctions métaboliques du spermatozoïde (Medeiros *et al.*, 2002; Bakhach *et al.*, 2007). Il s'ensuit une perte de motilité et de perméabilité sélective de la membrane au calcium (Medeiros *et al.*, 2002). Lorsque la concentration intracellulaire en calcium est très élevée, la motilité et la fertilité sont réduites (Collin *et al.*, 2000). Il en va de même pour la viabilité du spermatozoïde (Simpson et White, 1986). Le degré de dommage structurel dépend de la température et de la constitution en lipides des membranes (Bailey *et al.*, 2003).

1.4.1.2 Cristallisation

L'eau est essentielle à la structure et au bon fonctionnement des cellules vivantes. Le phénomène de cristallisation se produit lors du passage de l'eau à l'état solide. La formation de glace extracellulaire serait activatrice du processus de cristallisation intracellulaire (Mazur, 1965; Toner, 1993). La présence de cristaux dans le milieu extracellulaire crée un gradient de concentration qui favorise la sortie d'eau de la cellule au profit de l'entrée des solutés. À basse température, la membrane cellulaire modifie son coefficient de perméabilité et se comporte comme une membrane semi-perméable (Andersen, 1969; Mazur, 1984). De plus, la vitesse de refroidissement de la semence détermine si la formation des cristaux de glace sera intra ou extracellulaire lors de la congélation. La cristallisation extracellulaire modifie l'environnement chimique des cellules et génère des contraintes mécaniques qui vont déformer les cellules (Bakhach *et al.*, 2007). D'autre part, la cristallisation intracellulaire combinée à la déshydratation de la cellule peut former des lésions aux membranes des organelles intracellulaires (Bakhach *et al.*, 2007).

1.4.1.3 Stress osmotique

Au cours de la congélation des spermatozoïdes, la formation de cristaux extracellulaires augmente l'osmolarité de l'eau intracellulaire et provoque sa sortie et la déshydratation de la cellule. Les cryoprotectants sont très importants pour empêcher la formation de cristaux extracellulaires (Medeiros *et al.*, 2002). Le cryoprotectant le plus utilisé pour la semence de mammifère est le glycérol. Durant le processus de congélation, l'ajout de cryoprotectants au diluant de la semence crée un stress osmotique plus ou moins important selon sa perméabilité. Les dommages cellulaires dépendent alors des éléments constitutifs de la membrane, tels le ratio cholestérol / phospholipides, le degré de saturation de la chaîne hydrocarbonée et le ratio protéines / phospholipides (Parks, 1997). La concentration finale de cryoprotectants dans un médium détermine son effet sur la cellule. Les cellules exposées à des concentrations élevées de cryoprotectants subiront une déshydratation et une perte de volume intense. On appelle limite de tolérance osmotique le degré auquel la cellule peut maintenir sa viabilité malgré les variations de volumes cellulaires causées par les stress osmotiques (Bever-Gilmore, 1998). L'osmolarité optimale des diluants de semence de boucs, c'est-à-dire celle qui occasionne le moins de dommages cellulaires, se situe entre 425 et 525 mOsm selon Bowen (1988).

1.4.2 Procédés de congélation de la semence

La cryoconservation de la semence peut se résumer en quelques étapes :

- Récolte de la semence fraîche
- Dilution de la semence dans un diluant
- Retrait ou non du plasma séminal
- Refroidissement de la semence entre 0 et 10°C
- Ajout de cryoprotectants
- Congélation de la semence

- Entreposage de la semence dans l'azote liquide à -190°C

1.4.2.1 Récolte de la semence

La semence de bouc est habituellement récoltée à l'aide d'un vagin artificiel ou par électroéjaculation. Alors que la première méthode nécessite l'entraînement des boucs à la collecte, la seconde peut s'effectuer sur des boucs inexpérimentés à la récolte.

Le vagin artificiel est constitué d'un entonnoir de silicone fixé à une extrémité sur un tube de caoutchouc gonflé d'eau à 37°C et à l'autre sur une éprouvette graduée baignant dans un cylindre rempli d'eau à 37°C. Les vagins artificiels sont entreposés dans une armoire maintenue à 37°C avant leur utilisation. Avant la récolte, la partie abdominale et l'intérieur du fourreau du bouc doivent être soigneusement nettoyés à l'aide d'une solution saline à 0,9 % de NaCl (Baril *et al.*, 1993). Le bouc est amené derrière la chèvre boute-en-train en chaleurs qui est immobilisée. La récolte se fait à l'intérieur du vagin artificiel par l'interception du pénis lors de l'érection. La semence fraîche doit être conservée à 37°C pour en faire l'analyse.

La semence de bouc peut également être récoltée par électroéjaculation. Une sonde rectale de 20 mm de diamètre, sur laquelle sont disposés deux électrodes de 100 mm x 7 mm, est lubrifiée et insérée délicatement dans le rectum de l'animal. Une stimulation intermittente est obtenue par l'augmentation progressive de la puissance des décharges électriques (jusqu'à 15 V) en alternance avec 0 V toutes les trois ou cinq secondes (Ortiz-de-Montellano *et al.*, 2007). Le temps complet de l'opération est d'environ une minute.

1.4.2.2 Dilution de la semence dans un diluant

Aux fins d'inséminations artificielles, la concentration finale de la semence de boucs congelée devrait se situer entre 80 et 500 x 10⁶ spz/mL (Mazur, 1984; Ritar et Salamon, 1991; Karatzas *et al.*, 1997). Les diluants de la semence utilisés pour la cryoconservation permettent la protection des spermatozoïdes contre les chocs thermiques et les phénomènes de cristallisation. De plus, les diluants sont une source d'énergie pour les cellules et permettent le maintien d'un milieu de survie temporaire pour les spermatozoïdes (Purdy, 2006b).

Généralement, les diluants de congélation de la semence sont composés de cryoprotectants non pénétrants et pénétrants, d'un tampon, d'un ou plusieurs sucres, de sels et d'antibiotiques (Evans et Maxwell, 1987).

1.4.2.2.1 Cryoprotectants non pénétrants

Les cryoprotectants non pénétrants ne peuvent pas traverser la membrane plasmique du spermatozoïde. Leur action à l'extérieur de la cellule permet d'enrober les cristaux de glace formés par la congélation et protège ainsi les spermatozoïdes des déformations et lésions cellulaires. La présence de cryoprotectants non pénétrants augmente la concentration ionique du milieu extracellulaire et crée un gradient de concentration qui favorise la déshydratation du spermatozoïde (Purdy, 2006b), ce qui retarde la formation de glace intracellulaire. La conservation de la cellule est ainsi favorisée.

Les cryoprotectants non pénétrants les plus utilisés chez le bouc sont le jaune d'œuf et le lait, à des concentrations de 1,5 à 20 % (v/v) et de 10 % p/v respectivement (Salamon et Ritar, 1982). Les concentrations en cryoprotectants varient selon le protocole de congélation utilisé (avec ou sans plasma séminal). Les mécanismes d'action de ces ingrédients sur la semence ne sont pas encore tout à fait élucidés.

Lors de la congélation, les protéines du plasma séminal ont des effets délétères sur la semence de boucs. La présence de jaune d'œuf ou de lait protège le spermatozoïde des pertes de cholestérol et de phospholipide de la membrane en diminuant la liaison des protéines du plasma séminal à la membrane plasmique (Bergeron *et al.*, 2007).

Dans le jaune d'œuf, les lipoprotéines de faibles densités interagissent avec les protéines du plasma séminal. Il a été démontré que le jaune d'œuf protège la semence de la transition des lipides membranaires (Drobnis *et al.*, 1993) provoquée par les chocs thermiques (Watson, 1990). Sa présence dans le diluant augmente le ratio cholestérol / phospholipides de la membrane plasmique (Parks *et al.*, 1981), ce qui diminue la fluidité membranaire et les lésions cellulaires.

Le lait est dépourvu de lipoprotéines, son mécanisme de protection est basé sur la fixation de la protéine caséine à la membrane plasmique du spermatozoïde (Bergeron et Manjunath, 2006, 2007). Cette fixation de la caséine du lait au spermatozoïde minimise la perte de lipides par la membrane plasmique et permet de maintenir la motilité et la viabilité de la semence pendant la congélation (Bergeron *et al.*, 2007).

1.4.2.2.2 Cryoprotectants pénétrants

Les cryoprotectants pénétrants sont de faible poids moléculaire et sont perméables à la membrane plasmique du spermatozoïde (Bakhach *et al.*, 2007). Ils agissent à l'intérieur et à l'extérieur de la cellule (Purdy, 2006b). Lorsqu'ils sont à l'extérieur, ces cryoprotectants augmentent l'osmolarité du diluant et stimulent la déshydratation de la cellule. La perte d'eau intracellulaire du spermatozoïde le dispose à la congélation (Medeiros *et al.*, 2002). Lorsque ces cryoprotectants sont à l'intérieur de la cellule, ils diminuent le stress osmotique de la cellule causé par la déshydratation (Medeiros *et al.*, 2002). Cette sortie d'eau du spermatozoïde diminue son point de congélation et réduit les phénomènes de cristallisation intracellulaire (Purdy, 2006b). Les cryoprotectants pénétrants sont généralement utilisés à des concentrations de 1 à 8 % (Purdy, 2006b).

Le glycérol est le cryoprotectant pénétrant le plus utilisé pour la semence de bouc et peut être ajouté à différents moments du processus de congélation (Purdy, 2006b). À une concentration de 0,5 M, le glycérol contribue au changement de la structure des lipides membranaires du spermatozoïde, ce qui lui procure une stabilité et une perméabilité à l'eau (Holt, 2000). Le glycérol n'est pas nocif pour la semence et les spermatozoïdes de bouc sont peu sensibles au stress osmotique créé par le glycérol (Watson, 2000). Le glycérol est utilisé à des concentrations variant entre 1 et 8 %. Lors de la comparaison de l'efficacité de plusieurs cryoprotectants pénétrants, la concentration de 6 % de glycérol dans le diluant s'est avérée produire une meilleure conservation de la motilité des spermatozoïdes de la semence congelée (Kundu *et al.*, 2001). Corteel et Baril (1974, 1975) utilisent une concentration finale de 7 % de glycérol dans un diluant à base de lait, alors que Ritar et Salamon (1982) utilisent des concentrations de glycérol allant de 2 à 4 % dans un diluant à base de jaune d'œuf.

1.4.2.2.3 Sucres

Le glucose et le fructose sont des sucres simples, monosaccharides à faible poids moléculaire qui peuvent traverser la membrane plasmique du spermatozoïde. Pour leur part, les disaccharides (lactose, sucrose, raffinose tréhalose) ne peuvent pas traverser la membrane plasmique. Ces derniers agissent comme cryoprotectants extracellulaires en créant une pression osmotique à l'extérieur de la cellule, ce qui diminue la formation de glace intracellulaire (Purdy, 2006b). Le type de sucres et sa concentration dans le diluant vont faire grandement varier l'osmolarité du milieu (de 6 à 375 mM) (Salamon et Ritar, 1982).

Le type de sucres ajouté à un diluant contenant du Tris a un effet sur la viabilité des spermatozoïdes (Salamon et Ritar, 1982). Après comparaison des sucres à des concentrations de 41,625, 83,250 et 124,825 mM, il semble que le glucose et le fructose soient plus adéquats comme source de sucres dans un diluant de semence de boucs que le lactose ou la raffinose (Salamon et Ritar, 1982). Dans une solution à base de Tris, Salamon (1982) suggère 41,625 mM de glucose pour conserver une motilité et une viabilité optimum après décongélation. Dans un diluant à base de lait écrémé, le glucose améliore significativement la motilité après dégel et cet avantage demeure 6 h après incubation (Salamon et Ritar, 1982).

1.4.2.2.4 Tampon

Salamon et son équipe (1982) ont démontré que l'ajout de composés tamponnés dans les diluants a un impact sur la qualité de la semence. Cette même étude établit que les concentrations du Tris (300, 375 ou 400 mM) ne créent pas de différence sur la motilité de la semence après décongélation, mais influence sa viabilité. La semence de bouc tolère des concentrations de Tris allant jusqu'à 600 mM mais l'osmolarité de la solution est alors élevée (Purdy, 2006b), ce qui n'est pas souhaitable. En effet, il semble que le tampon Tris soit le plus approprié à la semence de bouc. Salamon et son équipe (1982) ont conclu qu'une concentration de 450 mM de Tris permettrait le meilleur taux de survie des spermatozoïdes après décongélation. Dans son étude, Tuli (1992) a observé que le Tris, comparativement à d'autres tampons, permet d'obtenir de meilleures motilités et viabilités de la semence fraîche et décongelée de boucs Bœr. Les tampons aident à la

déshydratation cellulaire par l'augmentation de la stabilité membranaire (Molinia *et al.*, 1994). De plus amples recherches seront nécessaires afin de déterminer avec exactitude les mécanismes d'action des tampons sur la semence lors de la congélation.

1.4.2.2.5 Sels

Il existe différents protocoles d'utilisation des sels (citrate de sodium, acide citrique) dans les diluants de congélation de la semence. L'acide citrique semble être le plus utilisé à des concentrations variant entre 75 et 124 mM (Ritar et Salamon, 1991; Molinia *et al.*, 1994).

1.4.2.2.6 Antibiotiques

Les agents cryoprotectants permettent non seulement la conservation des cellules germinales, mais également des bactéries. Il est donc nécessaire d'ajouter des antibiotiques au diluant de la semence pour freiner la propagation de bactéries. Les concentrations suggérées dans un diluant à base de jaune d'œuf sont présentées dans le tableau 1.4.

Tableau 1.4 Concentrations d'antibiotiques utilisées par différents auteurs dans la préparation de diluant de congélation pour la semence de boucs.

Auteur	Pénicilline	Streptomycine
Chauhan et Anand, 1990	1000 UI/mL	1 mg/mL
Cabrera <i>et al.</i> , 2005	500 UI/mL	0,05 %
Peterson <i>et al.</i> , 2007	0,3 mg/mL	0,5 mg / mL *dihydrostreptomycine
Batista <i>et al.</i> , 2009	500 UI/mL	0,05 %

1.4.2.3 Méthode sans plasma séminal

L'importance de retirer le plasma séminal réside dans la présence d'enzymes sécrétés par les glandes bulbo-urétrales (EYCE et BUSpg60). Ces enzymes interagissent avec les triglycérides du lait et la lécithine de l'œuf libérant des composés toxiques pour la semence (Purdy, 2006b). Lors de la dilution de la semence dans un milieu à base de lait

écrémé, le retrait du plasma séminal permet l'obtention d'une motilité individuelle des spermatozoïdes très significativement supérieure à la même semence non lavée (Corteel et Baril, 1974).

Chez le bouc, le retrait du plasma séminal de la semence consiste à diluer la semence fraîche dans une solution de lavage à concentration 1 :5 ou 1 :10 et à centrifuger le milieu de 10 à 15 min à raison de 600 à 1000 g puis d'enlever le surnageant qui est en fait le plasma séminal. Le nombre de centrifugations ainsi que la concentration en spermatozoïdes dans le milieu jouent un rôle important sur la qualité de la semence après lavage. Deux centrifugations et retraits du surnageant de la semence sont nécessaires avant la congélation pour optimiser la motilité de la semence après la décongélation (Ritar et Salamon, 1982). La solution de lavage peut être un tampon de phosphate (Leboeuf *et al.*, 2003), un tampon à base de Tris (Islam *et al.*, 2006), ou de Tris et d'acide citrique (Dorado *et al.*, 2010) ou encore, une solution de Krebs-Ringer-phosphate-glucose (Corteel et Baril, 1975).

Une seconde méthode de lavage a été établie par Ritar et Salamon (1982). Il est possible de remplacer deux phases de centrifugations par une seule à condition de diluer la semence à 1 :20 dans la solution de lavage.

Cependant, le retrait du plasma séminal par centrifugation est une manipulation qui peut avoir un impact négatif sur la survie des spermatozoïdes surtout lorsque la semence est récoltée en contre-saison et congelée dans un diluant à base de 6 ou 12 % de jaune d'œuf (Cabrera *et al.*, 2005). L'étude de Corteel (1981) a également démontré que le lavage détériorait la qualité de la semence et que cette manipulation n'améliorait pas la fécondité de la semence (Corteel et Baril, 1975). Néanmoins, selon plusieurs chercheurs, le lavage de la semence avant sa congélation, tant dans un milieu à base d'œuf qu'à base de lait, est bénéfique pour la survie des spermatozoïdes puisqu'il permet de meilleures viabilités et motilités des spermatozoïdes, et ce, même après décongélation (Corteel et Baril, 1974; Ritar et Salamon, 1982).

D'autre part, Burcu et son équipe (2009) ont étudié l'impact du lavage de la semence de boucs Saanens selon trois concentrations de jaune d'œuf (6, 12 et 18 %) dans

un diluant à base de Tris sans glycérol. Le retrait du plasma séminal pour la semence congelée avec 18 % de jaune d'œuf mène à une meilleure motilité, viabilité et à une plus faible réaction de l'acrosome immédiatement après la décongélation. Le retrait ou non du plasma séminal de la semence dépendrait donc de la concentration en jaune d'œuf ou en lait du diluant de la semence.

Peu d'informations sont disponibles sur la relation entre le lavage de la semence et sa fertilité. Cependant, on peut noter que Waide et son équipe (1977) ont obtenu un taux de gestation de 73 % suite aux IA chez les chèvres à l'aide de la semence congelée dans le jaune d'œuf avec plasma séminal. De son côté, Fougner (1979) a obtenu un taux de gestation de 63 % suite aux IA chez les chèvres à l'aide de semences congelées dans le jaune d'œuf sans plasma séminal.

1.4.2.4 Méthode avec plasma séminal

Une technique de congélation avec plasma séminal peut-être réalisée avec un diluant à base d'œuf. Il faut alors prendre en considération le cycle de photopériode pendant lequel la semence a été récoltée. La durée du cycle circadien influence la production de plasma séminal et donc les niveaux d'EYCE. L'utilisation de diluants de congélation (sans lavage) à base de Tris et de 1,5 % de jaune d'œuf n'a pas d'impact négatif sur la viabilité de la semence (Ritar et Salamon, 1982). À de plus fortes concentrations en jaune d'œuf dans le diluant, le retrait du plasma séminal doit être considéré puisque l'interaction entre l'EYCE et les lécithines de l'œuf a un effet délétère non négligeable sur la viabilité des spermatozoïdes (Ritar et Salamon, 1982).

1.4.2.5 Refroidissement et ajout de glycérol

Afin de minimiser les chocs thermiques potentiels, une fois diluée dans le milieu de congélation, la semence doit être placée au frais, à des températures variant selon les auteurs entre 4 et 15°C, et ce, d'une à quatre heures (Leboeuf *et al.*, 2000; Batista *et al.*, 2009). Par la suite, la semence est congelée ou additionnée de glycérol. L'ajout de cryoprotectants à la semence prévient les dommages intracellulaires causés par les chocs thermiques (Park, 1997). Suite à la glycérolisation de la semence, celle-ci doit subir une

période d'équilibration de 1 h 30 à 4-5°C avant d'être mise en paillettes (Leboeuf *et al.*, 2000).

Il existe plusieurs techniques d'ajout du glycérol au milieu de dilution de la semence. Les recherches ont tenté de comparer ces différentes méthodes afin de mettre au point le meilleur protocole de glycérolisation de la semence (Ritar et Salamon, 1982; Deka et Rao, 1986; Leboeuf *et al.*, 2003). Tuli et Holtz (1994) n'ont trouvé aucune différence de qualité de la semence liée à la température de glycérolisation. De plus, la glycérolisation peut se faire en un ou trois ajouts de glycérol (Ritar et Salamon, 1982; Deka et Rao, 1986; Leboeuf *et al.*, 2003).

1.4.2.6 Congélation

La congélation des spermatozoïdes est une étape cruciale à leur conservation. Bien qu'il soit commun de croire que la plus grande cause de perte cellulaire réside dans l'entreposage de la semence à de basses températures, Bakhach (2007) rapporte que les lésions cellulaires se produisent essentiellement lors du refroidissement de 35 à 15°C et de 0 à -80°C. De son côté, Drobnis et son équipe (1993) mentionnent que les changements membranaires les plus intenses surviennent de 5 à -15°C. De plus, Gao et son équipe (1997) ainsi que Mazur (1963) rapportent que la majorité des dommages cellulaires ont lieu autant pendant l'addition d'agents cryoprotectants que pendant la transition de températures intermédiaires entre -15 à -60°C lors de la congélation.

La vitesse de refroidissement influence le processus de déshydratation de la cellule et de la cristallisation. Le taux de diminution de la température devrait être assez lent pour permettre à l'eau de quitter la cellule, mais assez rapide pour empêcher la formation de cristaux intracellulaires, ce qui serait fatal pour celle-ci. La figure 1.7 illustre les conséquences des vitesses de congélation sur l'intégrité des cellules. Les octogones présentés dans la figure représentent les cristaux de glace. Lorsque les cristaux s'accumulent à l'intérieur de la cellule, la déshydratation ne se fait pas correctement et les cristaux endommageront la membrane et les organelles lors de la décongélation.

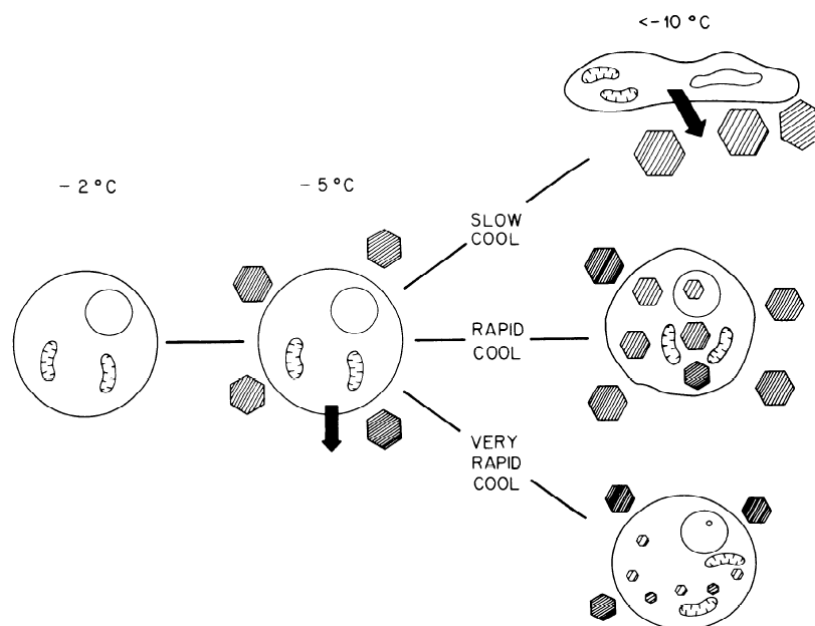


Figure 1.7 - Schéma des événements physiques se produisant pendant la congélation d'une cellule (Mazur, 1977).

La congélation de la semence de bouc peut se faire de deux façons : à l'aide de paillettes de plastique (de 0,5 ou 0,25 μL) ou sous forme de pastilles. Les paillettes sont couramment utilisées pour les IA et facilitent l'identification. Les pastilles permettent une congélation simple et rapide.

Le protocole de congélation doit être adapté au support de congélation de la semence. La méthode de congélation avec les paillettes dans l'azote liquide peut s'effectuer de façon manuelle sur les vapeurs d'azote liquide ou avec une machine qui contrôle le taux de refroidissement. En France, une technique de congélation utilisée consiste à refroidir les paillettes dans les vapeurs d'azote liquide avant de les y plonger définitivement pour les conserver à -196°C . Les paillettes sont disposées à l'horizontale, 16 cm au-dessus de l'azote liquide pendant deux minutes (Baril *et al.*, 1993). Elles sont ensuite descendues à 4 cm au-dessus de l'azote liquide pendant trois minutes avant d'être complètement immergées. Certains protocoles alternatifs utilisés par les chercheurs suggèrent de placer les paillettes de 3 à 5 cm au-dessus de l'azote liquide pendant 4 à 5 min (Leboeuf *et al.*, 2000) ou 20 min (Dorado *et al.*, 2007) avant de les immerger.

L'utilisation d'une machine de congélation permet de programmer différents taux de diminution de température pendant le processus de congélation. Peterson et son équipe (2007) utilisent deux taux de diminution de température alors que Purdy (2006b) et Basista (2009) en utilisent trois. Le tableau 1.5 regroupe quelques protocoles de congélation de la semence en paillettes avec une machine programmable.

Tableau 1.5 Comparaison de différents protocoles de congélation de la semence avec une machine programmable.

Étapes		Peterson <i>et al.</i> , 2007	Purdy, 2006b	Batista <i>et al.</i> , 2009
1	Températures	4 à -8°C	4 à -5°C	5 à -10°C
	Taux	-3,5°C/min	-4°C/min	-4,5 °C/min
2	Températures	-8 à -140°C	-5 à -110°C	-10 à -110°C
	Taux	-30°C/min	-25°C/ min	-25°C/min
3	Températures		-110 à -140°C	-110 à -140°C
	Taux		-35°C/min	-10°C/min

La technique de congélation de la semence en pastilles est fort simple. On dépose 0,1 ou 0,2 mL de semence sur la glace sèche à -79°C dans de petites cavités pendant 3 à 4 minutes. Les pastilles peuvent ensuite être plongées dans l'azote liquide (Baril *et al.*, 1993). Le tableau 1.6 présente un résumé des conséquences du refroidissement des cellules lors du processus de congélation de la semence.

Tableau 1.6 Résumé des impacts causés par le refroidissement cellulaire

Température °C	Impacts
37 à 15	« Choc thermique » (Bakhach <i>et al.</i> , 2007) Lésions cellulaires (Bakhach <i>et al.</i> , 2007)
5 à -15	Changements membranaires les plus intenses (Drobnis <i>et al.</i> , 1993)
0 à -25	Ralentissement de l'activité enzymatique cellulaire (Bakhach <i>et al.</i> , 2007)
0 à -80	Lésions cellulaires (Bakhach <i>et al.</i> , 2007) « Choc thermique » (Bakhach <i>et al.</i> , 2007)
-15 à -60	Majorité des dommages cellulaires (Mazur, 1963; Gao <i>et al.</i> , 1997)
≤ -40 à -130	Échanges physicochimiques gelés (Bakhach <i>et al.</i> , 2007)
≤ -130	Conservation cellulaire à long terme (Mazur, 1984; Medeiros <i>et al.</i> , 2002; Bakhach <i>et al.</i> , 2007)

1.4.2.7 Entreposage (durée de vie dans l'azote liquide)

À -196°C, température de l'azote liquide, les réactions métaboliques sont suspendues (Bakhach *et al.*, 2007). La conservation des cellules à ces températures cryogéniques est théoriquement efficace pour des centaines d'années. D'ailleurs, la principale cause de dommages cellulaires est davantage attribuée aux variations de température lors des processus de congélation et de décongélation qu'à leur entreposage dans l'azote liquide (Bakhach *et al.*, 2007).

Batista (2009) n'a pas observé de différence de motilité progressive, de réaction acrosomale ou d'anomalie entre les spermatozoïdes congelés dans le jaune d'œuf

et conservés dans l'azote liquide pendant 1, 30, 90 ou 365 jours. Il a également été démontré que la conservation de la semence dans l'azote liquide ne nuit pas à sa fertilité. En 1977, Waide a mis à l'essai le pouvoir fécondant de semence non lavée, diluée dans le jaune d'œuf et congelée pendant 0-30, 31-102 et 210-1022 jours. Il a démontré que la durée de conservation de la semence dans l'azote liquide n'influence pas son pouvoir fécondant. Dans le même ordre d'idées, Fougner (1979) n'a pas observé de différences de fertilité suite à des IA à l'aide de semences lavées, diluées dans le jaune d'œuf et congelées entre 365 et 1095 jours.

1.4.2.8 Décongélation

La décongélation de la cellule crée une recristallisation, c'est-à-dire l'amplification des cristaux de glace intracellulaire qui étaient présents après la congélation (Watson, 1990). Le réchauffement de la cellule favorise le réarrangement des lipides et protéines membranaires. Holt et son équipe (1992) ont expérimenté l'impact des processus de congélation et de décongélation sur la qualité de la semence de bélier en présence d'une sonde d'intégrité membranaire, la fluorescéine diacétate (FDA). Les résultats ont démontré que les bris de la membrane se produisaient pendant la décongélation.

Le processus de décongélation de la semence en paillettes s'effectue dans l'eau. Cependant, la température et la durée de décongélation diffèrent selon les chercheurs. Ainsi, la décongélation de la semence en paillettes à 37°C pendant 12 à 30 secondes permettrait une meilleure motilité qu'une décongélation à 5°C pendant 2 minutes. Dans le même ordre d'idées, une décongélation à 70°C pendant 7 secondes donnerait de meilleurs résultats de motilité et d'intégrité membranaire qu'une décongélation à 37°C pendant 2 minutes, ou 40°C pendant 20 secondes (Tuli *et al.*, 1991). De son côté, Anderson (1969) a démontré qu'une décongélation à 75°C pendant 10 secondes est plus efficace que 35°C pendant 30 secondes.

Néanmoins, les protocoles de décongélation des paillettes à 37°C pendant 30 secondes sont plus pratiques en conditions d'IA. Le tableau 1.7 présente différents protocoles de décongélation utilisés lors d'expérimentations sur la cryoconservation de la semence de boucs.

Tableau 1.7 Comparaison de différents protocoles de décongélation de la semence.

Études	Paillettes	Pastilles
Deka et Rao, 1986	Bain d'eau à 37°C de 12 à 30 secondes	
Ritar et Salamon, 1991		Dans un cylindre sec, déposé dans bain d'eau à 37°C jusqu'à ce que les pastilles fondent.
Aboagla et Terada, 2004		Dilution 1 :3 des pastilles dans une solution Tris-acide citrique-glucose (TCG) à 37°C pendant 3 minutes
Cabrera <i>et al.</i> , 2005	Bain d'eau à 37°C pendant 30 secondes	
Dorado <i>et al.</i> , 2007	Bain d'eau à 39°C pendant 30 secondes	
Peterson <i>et al.</i> , 2007	Bain d'eau à 37°C pendant 1 minute	
Batista <i>et al.</i> , 2009	Paillettes dans un bain d'eau à 37°C pendant 30 secondes	

1.5 Capacitation et hyperactivation

Lors de la maturation dans l'épididyme, les spermatozoïdes acquièrent le potentiel d'être mobiles, mais n'ont pas encore la capacité de féconder l'ovule (Thibault et Levasseur, 2001). La capacitation est, en quelque sorte, une maturation obligatoire du spermatozoïde éjaculé, pendant son passage dans le tractus femelle, lui permettant d'acquérir la réaction de l'acrosome, répondant à des glycoprotéines spécifiques de la zone pellucide de l'ovule pour le féconder (Bailey *et al.*, 2003). *In vitro*, la capacitation s'effectue dans un milieu simulant les fluides utérins (Cormier et Bailey, 2003).

1.5.1 Spécificité du tractus femelle relatif à la capacitation

In vivo, la capacitation se produit dans l'isthme à la suite de la fixation du spermatozoïde à l'épithélium de l'isthme. Une fois cette maturation terminée, les spermatozoïdes quittent l'isthme en vue de féconder l'ovule (Thibault et Levasseur, 2001). La capacitation *in vivo* n'est pas strictement spécifique aux organes (Thibault et Levasseur, 2001). Les spermatozoïdes peuvent être complètement capités sans pour autant avoir traversé l'oviducte.

La capacitation *in vitro* se produit par l'utilisation de fluides biologiques, tels les fluides de l'oviducte, les fluides folliculaires ou le sérum sanguin. Ces milieux sont composés d'albumine sérique, d'héparine (glycosaminoglycane), d'accepteurs de cholestérol et de lipoprotéines (Yanagimachi, 1994). La réussite de la fécondation *in vitro* (FIV) passe par la capacitation des spermatozoïdes, ce qui ne veut pas dire qu'une FIV échouée implique des spermatozoïdes non-capités (Thibault et Levasseur, 2001).

1.5.2 Capacitation et changements du spermatozoïde

Tous les spermatozoïdes d'un même éjaculat ne subiront pas la capacitation en même temps. Certains capiteront plus rapidement que d'autres pour permettre une large fenêtre de fertilisation de l'ovule. La majorité des changements produits lors de la capacitation ont lieu au niveau de la membrane plasmique du spermatozoïde. Thibault et Levasseur (2001) ont décrit la capacitation par trois principaux mécanismes. Le tableau 1.8 résume ces phénomènes.

Tableau 1.8 Mécanismes d'action de la capacitation des spermatozoïdes *in vivo*.

Mécanismes	Agent responsable
Enlèvement des protéines membranaires possédant un récepteur pour les glycanes	Glycosaminoglycanes
Enlèvement du cholestérol libre	Albumine et lipoprotéine HDL (« High density lipoproteines »)
Remaniement des chaînes oligosaccharidiques	Enzymes et entrée de Ca ²⁺

Adapté de Thibault et Levasseur, 2001

La capacitation permet de potentialiser les mécanismes de signalisation qui seront activés lors de la réaction de l'acrosome, telle l'hyperactivation (Leclerc, 2010). L'entrée de calcium dans le cytosol par les « *Store Operated Calcium Channels* » (SOCC) est essentielle au processus de capacitation et à l'initiation de la réaction de l'acrosome (Fraser *et al.*, 1995). Le spermatozoïde capacité possède une membrane plasmique fragile et susceptible à la détérioration ou à la réaction acrosomique spontanée, ce qui peut mener à sa perte si la fécondation n'a pas lieu (Bailey *et al.*, 2003).

1.5.3 Cryocapacitation et agents décapacitants

La capacitation peut se produire spontanément *in vitro*, dans un milieu spécifique, sans être en contact avec les fluides biologiques et sans liaison à un récepteur spécifique (Storey, 1995). Suite à l'observation des variations de flux de calcium dans les spermatozoïdes de la semence bovine fraîche et cryoconservée, Bailey et son équipe (2003) ont émis l'hypothèse que le refroidissement de la semence rend le spermatozoïde inapte à réguler correctement la concentration de calcium interne. Les processus de congélation et de décongélation auraient des conséquences encore plus néfastes sur la régulation du calcium, d'où l'observation d'une concentration de calcium intracellulaire supérieure chez les spermatozoïdes vivants pendant les étapes de refroidissement, de congélation et de décongélation que pendant la dilution de la semence fraîche.

Les dommages subis par la cellule suite à la congélation sont similaires aux changements membranaires causés par la capacitation (Bailey *et al.*, 2000). Les mécanismes d'action de la cryocapacitation ne sont pas encore complètement compris à ce jour.

Les agents « *décapacitants* » sont des molécules présentes dans le plasma séminal qui stabilisent la surface du spermatozoïde pour prévenir sa capacitation prématurée. Chez le bovin, les protéines du plasma séminal (BSP, *Binder of Sperm*) sont reconnues pour leur action décapacitante (Thérien *et al.*, 1995, Deagileva *et al.*, 1999). Les BSP se lient aux phospholipides cholines de la membrane plasmique du spermatozoïde. Les phospholipides choline et certains autres lipides membranaires, tel le cholestérol, sont déliés suite à l'action de l'héparine ou d'autres composés du tractus génital. Le ratio cholestérol / phospholipide de la membrane plasmique du spermatozoïde est un élément déterminant de la capacitation (Davis, 1981). La réduction de ce ratio par le retrait du cholestérol déstabilise la membrane plasmique et augmente son potentiel de fusion avec la membrane acrosomique.

1.5.4 Protocole de lecture des spermatozoïdes avec colorant CTC

Contrairement à la réaction de l'acrosome, la capacitation n'est pas associée à des modifications morphologiques, mais plutôt à des changements dans la composition en lipides de la membrane. La technique de marquage à la chlorotétracycline (CTC) permet d'observer de façon indirecte la capacitation et la réaction de l'acrosome des spermatozoïdes. La chlorotétracycline est une sonde fluorescente qui se lie au calcium intracellulaire, un élément clé de la capacitation et de la réaction de l'acrosome. Lorsqu'on l'utilise avec les spermatozoïdes, on peut observer trois types de patrons (figure 1.8) : normale (F), capacité (B) et réacté (AR). Lors de la réaction de l'acrosome, la membrane plasmique externe se brise, libérant tout le contenu du cytosol. Seule la région équatoriale de la tête du spermatozoïde reste en place d'où l'observation d'une mince ligne fluorescente chez les spermatozoïdes réactés (Ward et Storey, 1984).

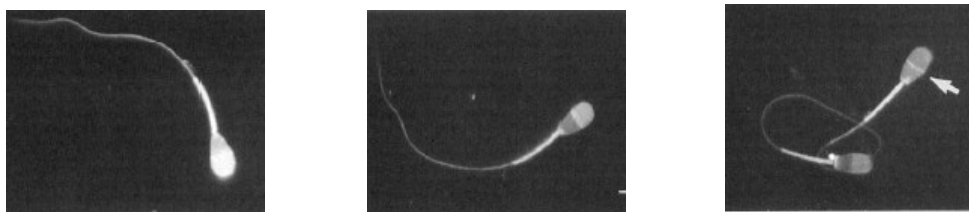


Figure 1.8 - Colorations CTC suite au marquage des spermatozoïdes normale (F), capacité (B), réacté (AR); (Fraser *et al.*, 1995) Adaptée de Bailey *et al.*, 2000.

A23187 est un ionophore de cations bivalents qui possède une grande affinité pour le calcium (Ca^{2+}). Il permet l'entrée de calcium dans le cytosol par l'échange de protons. Son utilisation dans les techniques de marquage de la semence provoque un influx de calcium intracellulaire provoquant, chez la plupart des spermatozoïdes en stade de capacitation, une réaction spontanée de l'acrosome. Cette réponse à l'ionophore A23187 permet d'explorer la cinétique de la capacitation des spermatozoïdes et leurs aptitudes à réaliser la réaction de l'acrosome (Fenichel *et al.*, 1991). L'utilisation de l'ionophore A23187 permet en quelque sorte d'imager ce qui se produira lorsque la cellule aura un influx de calcium (dans le tractus de la femelle par exemple). Cette technique pourrait être intéressante lorsqu'on s'intéresse principalement au rapport normaux / réactés.

Par contre, lorsque le marquage à la chlorotétracycline est utilisé dans le but de dresser un portrait exact de la qualité membranaire spermatique à un temps donné, l'utilisation d'A23187 est moins appropriée. Dans ce cas, il sera difficile d'évaluer la population réelle de spermatozoïdes capacités (patron B). Afin de vérifier l'impact d'A23187, on pourrait faire deux colorations à la chlorotétracycline : une sans ionophore de calcium, une autre avec ionophore de calcium.

1.6 Réaction de l'acrosome

1.6.1 Structure de l'acrosome

L'acrosome du spermatozoïde comprend deux sections principales : le contenu acrosomal et le segment équatorial. Le contenu acrosomal est riche en enzymes

hydrolytiques alors que le segment équatorial est vide d'enzymes (Yanagimachi, 1994). La zone pellucide de l'ovule est riche en glycoprotéines qui agissent comme un liant et se fixent aux récepteurs du spermatozoïde, déclenchant une chaîne de réactions menant à la réaction de l'acrosome. Les changements membranaires causés par la capacitation rendent les récepteurs spécifiques à la zone pellucide de la surface du spermatozoïde apparents et assurent la fixation de certaines protéines retrouvées dans la zone pellucide de l'ovule. Aussi, l'augmentation de la perméabilité au calcium suite à la capacitation rend possible la réaction de l'acrosome (Yanagimachi, 1994). Cette réaction crée la fusion entre la membrane acrosomique externe et la membrane plasmique et libère ainsi le contenu de l'acrosome. Les enzymes hyaluronidases et acrosines alors présentes à la surface du spermatozoïde peuvent digérer la zone pellucide et lui permettent de pénétrer la zone pellucide de l'œuf et de le féconder.

1.6.2 Réaction spontanée de l'acrosome

Lorsque la réaction de l'acrosome a lieu chez les spermatozoïdes mobiles présents dans un milieu capacitant, sans agents stimulants, on appelle le phénomène la « *réaction de l'acrosome spontanée* » (Yanagimachi, 1994). Il est généralement accepté que la réaction spontanée de l'acrosome soit un évènement sporadique non physiologique. Il existe deux principaux marquages à fluorescence des spermatozoïdes pour déterminer l'incidence de réaction de l'acrosome.

La lectine de *Pisum sativum* (PSA) marquée à la fluorescéine permet de marquer l'acrosome, tout le contenu de la tête du spermatozoïde ainsi que son flagelle (Lybaert *et al.*, 2009). La coloration PSA ne peut pénétrer une membrane acrosomique intacte. Cette coloration peut uniquement pénétrer les acrosomes réactés ou les membranes endommagées (Gillan *et al.*, 2005).

La lectine d'*Arachis hypogea* (« *peanut agglutinin* »; PNA) marquée à la fluorescéine est associée à la membrane acrosomique externe et se fixe uniquement à la région équatoriale du spermatozoïde (Lybaert *et al.*, 2009). Les spermatozoïdes ayant subi la réaction de l'acrosome démontrent une fluorescence au niveau de la bande équatoriale,

alors que les spermatozoïdes possédant un acrosome intact n'ont aucune fluorescence (Parinaud *et al.*, 1992).

Le marquage PNA aurait moins tendance à produire des liaisons non spécifiques à d'autres régions du spermatozoïde (Gillan *et al.*, 2005). Le marquage au PSA serait moins sélectif et, dans certains cas, il serait plus difficile de déterminer la présence ou l'absence d'acrosome (Lybaert *et al.*, 2009).

Ces techniques de coloration ne distinguent pas les réactions acrosomiques spontanées des réactions acrosomiques induites. Pour connaître le taux de réactions acrosomiques induites, on doit provoquer la réaction de l'acrosome ou encore simuler le milieu utérin. L'ionophore de calcium, un agent pharmacologique, ne simule en aucun cas le milieu utérin. Il permet l'entrée massive de calcium dans la cellule et provoque la réaction de l'acrosome.

Le liquide folliculaire est un inducteur moins puissant, mais son action se rapproche beaucoup plus du milieu physiologique. Son action est liée à son contenu en progestérone (Osman *et al.*, 1989) et son efficacité peut varier d'un échantillon à l'autre (Morales *et al.*, 1992).

La progestérone peut également être utilisée pour provoquer la réaction de l'acrosome. Cependant, les concentrations nécessaires sont très élevées (Parinaud *et al.*, 1992).

1.7 Hypothèses générales de la recherche du présent mémoire

- Les processus de cryoconservation de la semence à base d'œuf ou de lait permettent une qualité spermatique et un pouvoir fécondant similaires.
- L'utilisation d'une photopériode de 6 semaines de jours courts suivies de 6 semaines de jours longs pendant un an permet la récolte de la semence des boucs à des fins de congélation.

- La pratique des inséminations artificielles sur les chèvres en chaleurs synchronisées et en chaleurs naturelles permet d'obtenir des taux de fertilité et de mises-bas similaires.

1.8 Objectifs

- Comparer un protocole de congélation de la semence de boucs à base de jaune d'œuf et un à base de lait sur la qualité de la semence décongelée (de 0 à 5 h après décongélation).
- Évaluer l'impact du processus de congélation (jaune d'œuf vs lait) sur le taux de fertilité suite à des inséminations artificielles intracervicales sur les chèvres en chaleurs synchronisées.
- Observer les effets d'une photopériode de 6 semaines de jours courts suivies de 6 semaines de jours longs pendant un an sur l'activité sexuelle des boucs ainsi que sur la qualité de la semence fraîche et décongelée.
- Comparer l'efficacité des techniques de synchronisation des chaleurs ou de détection des chaleurs naturelles pour améliorer les résultats de fertilité en insémination.

Bibliographie

- Aamdal, J., O. Lyngset et K. Fossum. 1965. Toxic effect of lysolecithin on sperm. *Nord. Vet. Med.* 17: 633-639.
- Aboagla, E.M.E. et T. Terada. 2004. Effects of the supplementation of trehalose extender containing egg yolk with sodium dodecyl sulfate on the freezability of goat spermatozoa. *Theriogenology* 62: 809-818.
- Andersen, K. 1969. Insemination with frozen semen in goats. *Eur. Ass. Anim. Prod. Meeting* 2: 23-26.
- Bailey, J.L., J.F. Bilodeau et N. Cormier. 2000. Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitation phenomenon. *J. Androl.* 21: 1-7.
- Bailey, J.L., A. Morrier et N. Cormier. 2003. Semen cryopreservation: Successes and persistent problems in farm species. *Can. J. Anim. Sci.* 83: 393-401.
- Bakhach, J., V. Casoli et J.C. Guimberteau. 2007. La cryopréservation de tissus composites : principe, revue de la littérature et expérience de l'équipe bordelaise. *Ann. Chir. Plas. Est.* 52: 531-547.
- Baril, G., P. Chemineau, Y. Cognie, Y. Guérin, B. Lebœuf, P. Orgeur et J.C. Vallet. 1993. Manuel de formation sur l'insémination artificielle chez les ovins et les caprins, Nouzilly.
- Batista, M., T. Niño, D. Alamo, N. Castro, M. Santana, F. González, F. Cabrera et A. Gracia. 2009. Successful artificial insemination using semen frozen and stored by an ultrafreezer in the Majorera goat breed. *Theriogenology* 71: 1307-1315.
- Bergeron, A., Y. Brindle, P. Blondin et P. Manjunath. 2007. Milk caseins decrease the binding of the major bovine seminal plasma proteins to sperm and prevent lipid loss from the sperm membrane during sperm storage. *Biol. Reprod.* 77: 120-126.
- Bergeron, A., et P. Manjunath. 2006. New insights towards understanding the mechanisms of sperm protection by egg yolk and milk. *Mol. Repr. Dev.* 73: 1338-1344.
- Bever-Gilmore, J.A. 1998. *Fundamental cryobiology of mammalian spermatozoa*, Purdue University, Indiana.
- Boissard, K., F. Bordères, E. Bruneteau et B. Lebœuf. 2008. Rappels sur le fonctionnement et la maîtrise du cycle sexuel de la chèvre. *L'égide* 51: 2.

- Boukhlinq, R. 2002. Cours en ligne sur la reproduction ovine. In: I.A.V.H. II (ed.) No. 19 juillet 2010.
- Bowen, J.A., E.S. Fonda et D.L. Kooyman. 1988. Ultrastructural study of goat spermatozoa frozen at different diluent osmolarities. *J. Anim. Sci.* 39: 312-315.
- Burcu, U., G. Ulgen et N. Zelariya. 2009. Effect of seminal plasma, egg yolk, and season on the freezability of Saanen buck semen. *Bull. Vet. Inst. Pulawy* 53: 369-374.
- Cabrera, F., F. González, M. Batista, P. Calero, A. Medrano et A. Gracia. 2005. The Effect of Removal of Seminal Plasma, Egg Yolk Level and Season on Sperm Freezability of Canary Buck (*Capra hircus*). *Reprod. Domest. Anim.* 40: 191-195.
- Capgenes. 2004. Les 10 bonnes raisons de choisir les semences de boucs améliorateurs. Dans: <http://www.capgenes.com/spip.php?article58> . 2010, France.
- Chauhan, M.S. et S.R. Anand. 1990. Effect of egg yolk lipids on the freezing of goat semen. *Theriogenology* 34: 1003-1013.
- Chemineau, P., E. Normant, J.P. Ravault et J. Thimonier. 1986. Induction and persistence of pituitary and ovarian activity in the out-of-season lactating dairy goat after a treatment combining a skeleton photoperiod, melatonin and the male effect. *J. Reprod. Fertil.* 78: 497-504.
- Collin, S., M.A. Sirard, M. Dufour et J.L. Bailey. 2000. Sperm calcium levels and chlortetracycline fluorescence patterns are related to the in vivo fertility of cryopreserved bovine semen. *J. Androl.* 21: 938-943.
- Cormier, N. et J.L. Bailey. 2003. A differential mechanism is involved during heparin- and cryopreservation-induced capacitation of bovine spermatozoa. *Biol. Reprod.* 69: 177-185.
- Corteel, J.M. 1973. L'insémination artificielle caprine: Bases physiologiques, état actuel et perspectives d'avenir. *World Rev. Anim. Prod.* 9: 73-99.
- Corteel, J.M. 1977. Production, storage and artificial insemination of goat semen. Dans. *Management of reproduction in sheep and goat symposium.* p. 41-57, Madison.
- Corteel, J.M. 1980. Effets du plasma séminal sur la survie et la fertilité des spermatozoïdes conservés in vitro. *Reprod. Nutr. Dév.* 20: 1111-1123.
- Corteel, J.M. 1981. Collection, proceeding and artificial insemination of goat semen. In: *Goat Production Academic Press.* Gall, C., London.
- Corteel, J.M. et G. Baril. 1974. Viabilité des spermatozoïdes de boucs conservés et congelés avec ou sans leur plasma séminal: effet du glucose. *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.* 14: 741-745.

- Corteel, J.M. et G. Baril. 1975. Effet du «lavage» sur la conservation des spermatozoïdes de boucs à basse température. *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.* 15: 525-528.
- Corteel, J.M., G. Baril et B. Lebœuf. 1980. Residual seasonal variations in fertility in selected deep-frozen ejaculates of European dairy male goats. Dans: 9th Int. Congr. Anim. Reprod. A.I. No. 5. p. 422-425, Madrid.
- CRAAQ 2009. L'élevage de la chèvre. 439 pp.
- Davis, B.K. 1981. Timing of fertilization in mammals: sperm cholesterol/phospholipid ratio as a determinant of the capacitation interval. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 78: 7560-7564.
- Deagileva, E., S. Rubinstein et H. Breibart. 1999. Intracellular Ca²⁺ - Mg²⁺ - ATPase regulates calcium influx and acrosome exocytosis in bull and ram spermatozoa. *Biol. Reprod.* 61: 1226-1234.
- Deka, B.C. et A.R. Rao. 1986. Effect of glycerol level in Tris-base extender and equilibration period on quality of frozen goat semen. *Theriogenology* 26: 231-238.
- Delgadillo, J.A., M.T. Hochereau-de Reviere, A. Daveau et P. Chemineau. 1995. Effect of short photoperiodic cycles on male genital tract and testicular parameters in male goats (*Capra hircus*). *Reprod. Nutr. Dev.* 35: 58.
- Delgadillo, J.A., B. Lebœuf et P. Chemineau. 1991. Decrease in the seasonality of sexual behavior and sperm production in bucks by exposure to short photoperiodic cycles. *Theriogenology* 36: 755-770.
- Delgadillo, J.A., B. Lebœuf et P. Chemineau. 1992. Abolition of seasonal variations in semen quality and maintenance of sperm fertilizing ability by photoperiodic cycles in goat bucks. *Small. Ruminant. Res.* 9: 47-59.
- Delgadillo, J.A., B. Lebœuf et P. Chemineau. 1993. Maintenance of sperm production in bucks during a third year of short photoperiodic cycles. *Reprod. Nutr. Dev.* 33: 17.
- Dorado, J., A. Muñoz-Serrano et M. Hidalgo. 2010. The effect of cryopreservation on goat semen characteristics related to sperm freezability. *Anim. Reprod. Sci.* 121: 115-123.
- Dorado, J., I. Rodríguez et M. Hidalgo. 2007. Cryopreservation of goat spermatozoa: Comparison of two freezing extenders based on post-thaw sperm quality and fertility rates after artificial insemination. *Theriogenology* 68: 168-177.
- Drobnis, E.Z., L.M. Crowe, T. Berger, T.J. Anchordoguy, J.W. Overstreet et J.H. Crowe. 1993. Cold shock damage is due to lipid phase transitions in cell membranes: a demonstration using sperm as a model. *J. Exp. Zool.* 265: 7.

- Evans, G. et W.M.C. Maxwell (Editors). 1987. Salamon's artificial insemination of sheep and goats. Butterworths, Sydney, 200 pp.
- Fenichel, P., M. Donzeau, B. Hsi et N. Ayaraud. 1991. Le ionophore A23187: un test de fécondance du sperme avant FIV? *Andrologie*. 1: 15-16.
- Fleming, A.D. et R. Yanagimachi. 1981. Effects of various lipids on the acrosome reaction and fertilizing capacity of guinea pig spermatozoa with special reference to possible involvement of lysophospholipids in the acrosome reaction. *Gamete. Res.* 4: 253-273.
- Fougner, J.A. 1979. The intrauterine insemination in the goat with frozen sperms. Three years in practical use. *Zuchthygiene (Berl.)* 14: 10.
- Fraser, L.R., L.R. Abeydeera et K. Niwa. 1995. Ca(2+)-regulating mechanisms that modulate bull sperm capacitation and acrosomal exocytosis as determined by chlortetracycline analysis. *Mol. Repr. Dev.* 40.
- Gao, D.Y., P. Mazur et J.K. Critser. 1997. Fundamental cryobiology of mammalian spermatozoa. In: A.M. Karow and J.K. Critser (eds.). *Reproductive Tissue Banding: Scientific Principles*. p. 263-328. Academic Press, San Diego.
- Gillan, L., G. Evans et W.M.C. Maxwell. 2005. Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. *Theriogenology* 63: 445-457.
- Gingras, S. et P. Dumoulin. 2008. *Portrait des marchés des produits de la chèvre au Québec*. 35 pp.
- Harshan, H.M., L.P. Singh, M.R. Aragasamy, M.R. Asari et S. Kumar. 2006. Effect of buffalo seminal plasma heparin binding protein (HBP) on freezability and in vitro fertility of buffalo cauda spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.* 93: 124-133.
- Hartree, E.F. et T. Mann. 1961. Phospholipids in ram semen: metabolism of plasmalogen and fatty acids. *Biochem. J.* 80: 464-476.
- Hoffman, B., W. Leidl et H. Karg. 1992. Seasonal rhythm of reproduction in the male goat. 7th Intl. Cong. Anim. Reprod. A.I., Munich. 3 2065-2068.
- Holt, W.V. 2000. Basic aspects of frozen storage of semen. *Anim. Reprod. Sci.* 62: 3-22.
- Holt, W.V., M.F. Head et R.D. North. 1992. Freeze-induced membrane damage in ram spermatozoa is manifested after thawing - observations with experimental cryomicroscopy. *Biol. Reprod.* 46: 1086-1094.
- Iritani, A., Y. Nishikawa et S. Nagasawa. 1964. Studies on the egg-yolk coagulating enzyme in goat semen. VII. Variations in the enzyme activity of the semen between breeding season and

- non-breeding season, and in each ejaculate collected three times successively. *Jpn. J. Anim. Reprod.* 10: 6.
- Islam, R., K. Ahmed et B.C. Deka. 2006. Effect of holding and washing on the quality of goat semen. *Small. Ruminant. Res.* 66: 51-57.
- Karagiannidis, A., S. Varsakeli et G. Karatzas. 2000. Characteristics and seasonal variations in the semen of Alpine, Saanen and Damascus goat bucks born and raised in Greece. *Theriogenology* 53: 1285-1293.
- Karatzas, G., A. Karagiannidis, S. Varsakeli et P. Brikas. 1997. Fertility of fresh and frozen-thawed goat semen during the nonbreeding season. *Theriogenology* 48: 1049-1059.
- Kundu, C.N., J. Chakraborty, P. Dutta, D. Bhattacharyya, A. Ghosh et G.C. Majumder. 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., K. Das et G.C. Majumder. 2001. Effect of amino acids on goat cauda epididymal sperm cryopreservation using a chemically defined model system. *Cryobiology* 42: 21-27.
- La Falci, V.S.N., H. Tortorella, J.L. Rodrigues et A. Brandelli. 2002. Seasonal variation of goat seminal plasma proteins. *Theriogenology* 57: 1035-1048.
- Lebœuf, B., B. Restall et S. Salamon. 2000. Production and storage of goat semen for artificial insemination. *Anim. Reprod. Sci.* 62: 113-141.
- Lebœuf, B., V. Furstoss, P. Guillouet et P. Boué. 2004. Production on semen for artificial insemination from Alpine and Saanen bucks under different photoperiodic cycles. *S. Afr. J. Anim. Sci.* 34: 230-232.
- Lebœuf, B., B. Restall et S. Salamon. 2003. Production et conservation de la semence de boucs pour l'insémination artificielle. *INRA Prod. Anim.* 16: 91-99.
- Lebœuf, B., E. Manfredi, P. Boue, A. Piacère, G. Brice, G. Baril, C. Broqua, P. Humblot et M. Terqui. 1998. Artificial insemination of dairy goats in France. *Livestock Production Science* 55: 193-203.
- Leclerc, P. 2010. Capacitation, réaction acrosomale et fécondation. *Physiologie de la fonction reproductive mâle*, CHUL, Québec.
- Lybaert, P., A. Danguy, F. Leleux, S. Meuris et P. Lebrun. 2009. Improved methodology for the detection and quantification of the acrosome reaction in mouse spermatozoa. *Histol. Histopathol.* 24: 999-1007.

- Mazur, P. 1963. Kinetics of water loss from cells at subzero temperatures and the likelihood of intracellular freezing. *J. Gen. Physiol.* 47: 347-369.
- Mazur, P. 1965. The role of cell membranes in the freezing of yeast and other single cells. *Ann. NY. Acad. Sci.* 125: 76.
- Mazur, P. 1977. The role of intracellular freezing in the death of cells cooled at supraoptimal rates. *Cryobiology* 14: 251-272.
- Mazur, P. 1984. Freezing of living cells: mechanisms and implications. *Am. J. Physiol. Cell. Ph.* 247: C125-C142.
- Medeiros, C.M.O., F. Forell, A.T.D. Oliveira et J.L. Rodrigues. 2002. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? *Theriogenology* 57: 327-344.
- Mendoza, G., I.G. With, P. Chow. 1989. Studies of chemical components of Angora goat seminal plasma. *Theriogenology* 32 : 455-466
- Molinia, F.C., G. Evans et W.M.C. Maxwell. 1994. In vitro evaluation of zwitterion buffers in diluents for freezing ram spermatozoa. *Reprod. Nutr. Dev.* 34: 491-500.
- Morales, P., M. Llanos, G. Gutierrez, P. Kohen, P. Vigil et D. Vantman. 1992. The acrosome reaction-inducing activity of individual human follicular fluid samples is highly variable and is related to the steroid content. *Hum. Reprod.* 7: 646-651.
- Morisset, M., C. Batailler, V. Lamarche et I. Charron. 2006. Étude de la demande québécoise en fromages fins, Québec. 133 pp.
- Ortavant, R., J. Pelletier, J.P. Ravault, J. Thimonier et P. Volland-Nail. 1985. Photoperiod: main proximal and distal factor of the circannual cycle of reproduction in farm mammals. *Oxf. Rev. Reprod. Biol.* 7: 45.
- Ortiz-de-Montellano, M., F. Galindo-Maldonado, E.O. Cavazos-Arizpe, A.M. Aguayo-Arceo, J.F.J. Torres-Acosta et A. Orihuela. 2007. Effect of electro-ejaculation on the serum cortisol response of Criollo goats (*Capra hircus*). *Small. Ruminant. Res.* 69: 228-231.
- Osman, R.A., M.L. Andria, A.D. Jones et S. Meizel. 1989. Steroid induced exocytosis: The human sperm acrosome reaction. *Biochem. Bioph. Res. Co.* 160: 828-833.
- Parinaud, J., B. Labal et G. Vieitez. 1992. High progesterone concentrations induce acrosome reaction with a low cytotoxic effect. *Fertil. Steril.* 58: 599-602.
- Parks, J.E. 1997. Hypothermia and mammalian gametes. In: M.K. Armand and K.C. John (éds.). *Reprod. Tiss. Bank.* p. 229-261. Academic Press, San Diego.

- Parks, J.E., T.N. Mecham et R.G. Saacke. 1981. Cholesterol and phospholipids of bovine spermatozoa. II. Effect of liposomes prepared from egg phosphatidylcholine and cholesterol on sperm cholesterol, phospholipids, and viability at 4°C and 37°C. *Biol. Reprod.* 24: 399-404.
- Pellicer, M.T., T. Magallon et Y. Combarrous. 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.
- Pérez, B. et E. Mateos. 1996. Effect of photoperiod on semen production and quality in bucks of Verata and Malagueña breeds. *Small. Ruminant. Res.* 23: 23-28.
- Peterson, K., M.A.P.M. Kappen, P.J.F. Ursem, J.O. Nöthling, B. Colenbrander et B.M. Gadella. 2007. Microscopic and flow cytometric semen assessment of Dutch AI-bucks: Effect of semen processing procedures and their correlation to fertility. *Theriogenology* 67: 863-871.
- Purdy, P.H. 2006b. A review on goat sperm cryopreservation. *Small. Ruminant. Res.* 63: 215-225.
- Ritar, A.J. et S. Salamon. 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: 12.
- Ritar, A.J. et S. Salamon. 1991. Effects of month of collection, method of processing, concentration of egg yolk and duration of frozen storage on viability of Angora goat spermatozoa. *Small. Ruminant. Res.* 4: 29-37.
- Salamon, S. et A.J. Ritar. 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.
- Sawyer, D.E. et D.B. Brown. 1995. The use of an in vitro sperm activation assay to detect chemically induced damage of human sperm nuclei. *Reprod. Toxicol.* 9: 351-357.
- Simpson, A.M. et I.G. White. 1986. Effect of cold shock and cooling rate on calcium uptake of ram spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.* 12: 131-143.
- Storey, B.T. 1995. Interactions between gametes leading to fertilization: the sperm's eye view. *Reprod. Fertil. Dev.* 7: 42.
- Thérien, I., G. Bleau et P. Manjunath. 1995. Phosphatidylcholine-binding proteins of bovine seminal plasma modulate capacitation of spermatozoa by heparin. *Biol. Reprod.* 52: 9.
- Thibault, C. et M.C. Levasseur. 2001. *La reproduction chez les mammifères et l'homme*. Ellipses éd, Paris, 928 pp.

- Toner, M. 1993. Nucleation of ice crystals inside biological cells. In: P. Steponkus (ed.). *Advances in low temperature biology*. p. 51. JAI Press, London.
- Tuli, R.K. et W. Holtz. 1992. The effect of season on seminal characters in Bøer goat bucks in the Northern temperate zone. In: *R.a.i.g. production* (ed.). p. 1195-1200. Lokeshwar, New Delhi.
- Tuli, R.K. et W. Holtz. 1994. Effect of glycerolization procedure and removal of seminal plasma on post-thaw survival and got-release from Bøer goat spermatozoa. *Theriogenology* 42: 547-555.
- Tuli, R.K. et W. Holtz. 1995. Effect of season on the freezability of Bøer goat semen in the northern temperate zone. *Theriogenology* 43: 1359-1363.
- Tuli, R.K., R. Schmidt-Baulain et W. Holtz. 1991. Influence of thawing temperature on viability and release of glutamic oxaloacetic transaminase in frozen semen from Bøer goats. *Anim. Reprod. Sci.* 25: 125-131.
- Upreti, G.C., E.L. Hall, D. Koppens, J.E. Oliver et R. Vishwanath. 1999. Studies on the measurement of phospholipase A₂ (PLA₂) and PLA₂ inhibitor activities in ram semen. *J. Anim. Reprod. Sci.* 56: 107-121.
- Waide, Y., T. Niwa et R. Asanuma. 1977. Studies on preservation of liquid and frozen semen of domestic animals. 3. Viability and fertility of frozen goat semen. *Jpn. J. Anim. Reprod.* 23: 129-137.
- Walken-Brown, S.W., B.J. Restall et W.A. Taylor. 1994. Testicular and epididymal sperm content in grazing cashmere bucks: seasonal variation and prediction from measurements in vivo. *Reprod. Fertil. Dev.* 6: 727-736.
- Ward, C.R. et B.T. Storey. 1984. Determination of the time course of capacitation in mouse spermatozoa using a chlortetracycline fluorescence assay. *Dev. Biol.* 104: 287-296.
- Watson, P.F. 1990. Artificial insemination and the preservation of semen. In: L. G.E. (ed.). *Marshall's Reproduction*. Churchill Livingstone, Edinburg.
- Watson, P.F. 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *J. Anim. Reprod. Sci.* 60-61: 481-492.
- Xu, Y. 2001. A study of melatonin on it's mecanism of action as a prospective antidepressant in an transgenic mouse model with impared glucocorticoid receptor function, Université Laval, Québec.
- Yanagimachi, R. 1994. Mammalian fertilization. In: E. Knobil and J.D. Neil (ed.). *The physiology of reproduction*, 2nd edition. p. 189-317. Raven Press, New York.

Chapitre 2 : Comparaison de deux techniques de cryoconservation de la semence de boucs, basée sur la qualité après décongélation et sur la fertilité.

2.1 Résumé

Depuis les dix dernières années, la demande des consommateurs québécois pour les produits de la chèvre est en augmentation. Relativement à cette situation, il est nécessaire d'améliorer la productivité des troupeaux caprins québécois. La pratique d'inséminations artificielles (IA) par l'usage de semences génétiquement supérieures est une stratégie d'amélioration des troupeaux. Cependant, relativement peu de recherches ont été menées sur le raffinement des méthodes de congélation de la semence chez le bouc. Une technique quelque peu complexe largement utilisée en France nécessite le retrait du plasma séminal et la congélation de la semence dans un diluant à base de lait. À l'opposé, une technique de congélation relativement simple à base de jaune d'œuf pourrait être facilement applicable aux situations de congélation à la ferme. C'est pourquoi le but de cette étude est de comparer deux techniques de congélation de la semence de boucs : à base de lait ou de jaune d'œuf. Pour valider l'hypothèse que ces deux techniques de congélation permettent des résultats équivalents, la qualité de la semence décongelée et son pouvoir fécondant *in vivo* par les IA ont été évalués. Chaque semence récoltée (n = 28 éjaculats provenant de 7 boucs) a été divisée en deux et soumise aux deux processus de congélation. La motilité spermatique a été caractérisée de 0 à 5 heures après décongélation à l'aide du CASA (*Computer Assisted Sperm Analysis*) et l'évaluation de la viabilité, de l'intégrité de l'acrosome et des mitochondries a été effectuée à l'aide d'un cytomètre en flux. Trente-sept chèvres laitières ont été inséminées à l'aide de semences congelées dans les deux protocoles. Le taux de gestation a été détecté par échographie abdominale 40 jours après les inséminations. Les spermatozoïdes congelés dans le protocole à base de lait ont montré de meilleures viabilités, intégrités de l'acrosome et activités des mitochondries à différents temps entre 0 et 5 h après décongélation comparativement aux spermatozoïdes congelés dans le diluant à base de jaune d'œuf ($P < 0,05$). Malgré la qualité de semence obtenue avec le diluant à base de lait, le taux de fertilité varie selon le bouc : le taux de gestation a été de 71 % (12/17 chèvres) avec le diluant à base de lait comparativement à

40 % (6/14 chèvres) avec le diluant à base de jaune d'œuf ($P = 0,08$). Le taux de mise-bas a été de 71 % (12/17) pour le diluant à base de lait et de 43 % (5/14) pour le diluant à base de jaune d'œuf ($P = 0,10$). Ces résultats proposent que le protocole de congélation à base de lait, bien que plus complexe, mérite d'être adapté pour les pratiques à la ferme.

2.2 Abstract

Consumer demand for goat dairy products in the province of Quebec has dramatically increased over the past ten years. To accommodate to this strong demand, it is necessary to improve the productivity of the Quebec herd. Artificial insemination using semen from genetically-superior bucks is a well-established strategy for herd improvement, although little research has been conducted to refine semen cryopreservation protocols in this species. A relatively complex technique involving seminal plasma removal and milk-based diluents is well-established and commercially used in France. In contrast, a simpler, egg yolk-based protocol could be easier to carry out on-farm in Quebec, where cryopreserved goat semen is not readily available. Therefore, the aim of this study was to compare two goat semen cryopreservation techniques: an egg yolk-based protocol and a milk-based protocol. To test the hypothesis that these two techniques yield equivalent results, post-thaw semen quality and fertility *in vivo* using artificial insemination were assessed. Semen ($n = 28$ ejaculates from 7 bucks) was divided in two aliquots and subjected to each cryopreservation procedure. Sperm motility was characterized from 0 to 5 hours after thawing by Computer Assisted Sperm Analysis (CASA) while evaluation of viability, acrosomal integrity and mitochondria polarization was performed by flow cytometry. Female dairy goats were inseminated using cryopreserved semen according to one of the two techniques. Pregnancy rate was detected 40 days after inseminations using ultrasound. Semen cryopreserved using the milk-based protocol were significantly more motile, more viable, had more intact acrosomes, and more polarized mitochondria from 0 to 5 h post-thaw than using the egg yolk-based method ($P < 0.05$). Fertility rates varied due to buck, although the milk-based protocol tended to be superior: pregnancy rate was 71 % (12/17 females) with the milk-based technique versus 40 % (6/15 females) with the egg yolk-based protocol ($P = 0.08$), and kidding rates were 71 % (12/17) using the milk-based protocol and 43 % (6/14) with the egg yolk-based technique ($P = 0.10$). These results

indicate, therefore, that the more complex milk-based cryopreservation protocol is more effective. Nonetheless, although milk-based protocol might be a bit hardly applicable for on-farm process, results showed in this study demonstrate the positive impact of this protocol on semen quality and fertility and its potential to help promotion of artificial insemination in the Quebec goat herds, thereby, facilitating genetic improvement and increased productivity.

2.3 Introduction

Breeding improvement of farm species is the result of an intensive genetic selection supported by artificial insemination (AI) with the use of frozen semen (Leboeuf *et al.*, 2000). Thus, in response to growing consumer interest in goat products (milk, meat, hair), it is recommended that Quebec producers adopt AI to ameliorate herd productivity. The fertility success of AI using cryopreserved semen depends mainly on sperm quality post-thaw, which is largely influenced by extender components and the rates of semen dilution, cooling and thawing (Purdy, 2006b).

Cryopreservation induces detrimental effects on both sperm structure and function of spermatozoa (Bailey *et al.*, 2000; Medeiros *et al.*, 2002; Bakhach *et al.* 2007). As a result, various diluents ingredients and methods of processing have been developed to reduce freezing injuries (Parks and Graham, 1992; Watson, 2000; Bailey *et al.*, 2000). The most commonly used cryoprotectants for animal semen are egg yolk or milk with glycerol, which are known to minimize osmotic stress and intracellular crystallization during the different steps of the cryopreservation protocol (Medeiros *et al.*, 2002).

In that respect, the goat is different from other domestic species in that, harmful interactions between egg yolk or milk and buck seminal plasma have been well demonstrated (Chauhan and Anand, 1990; Pellecier *et al.*, 1997; Bergeron and Manjunath, 2006). On the one hand, Egg Yolk Coagulating Enzyme (EYCE) is a phospholipase A secreted by the bulbourethral glands under photoperiodic influence (Iritani *et al.*, 1964). In contact with egg yolk, EYCE hydrolyses sperm membrane phospholipids and releases fatty acids and lysolecithin, a lysophospholipid that causes sperm damage relative not only to its concentration in seminal plasma, but also to the concentration of egg yolk in the extender

(Iritani *et al.*, 1964; Ritar and Salamon, 1982; Leboeuf *et al.*, 2000). On the other hand, in contact with milk triglycerides, BUSpg60, a 55-60 kDa glycoprotein also secreted by the bulbourethral glands, releases fatty acids including oleic acid, leading to reduced sperm motility and acrosome deterioration and cell death (Leboeuf *et al.*, 2000, 2003). To minimize these harmful interactions while still protecting the sperm during freezing, cryopreservation techniques for goat semen are quite diverse and include different concentrations of cryoprotectants. Moreover, some cryopreservation protocols remove seminal plasma before dilution in milk (Corteel and Baril, 1974), while others report acceptable results with seminal plasma in extender including 15% egg yolk (Sanchez-Partida *et al.*, 1998; Purdy, 2006a). Nevertheless, the impact of egg yolk or milk freezing protocols on semen quality and its relation with fertility, have yet to be defined. On a practical level, however, seminal plasma removal for the milk-based protocol is technically complicated for on-farm semen cryopreservation and is used by the commercial AI industry in France. In contrast, the egg yolk-based protocol is quicker, relatively easy, and still effective (Purdy, 2006a).

Therefore, to determine which of these two protocols would be most appropriate for the Quebec dairy goat industry, we tested the hypothesis that semen quality and fertility would be similar, but that the egg yolk-based protocol would be easier to implement on-farm. To this end, the aim of this study was to compare the egg yolk-based and milk-based cryopreservation protocols to determine which (1) maintains the goat sperm motility, viability, acrosome and mitochondrial integrity up to 5 hours (h) after thawing, using CASA and flow cytometry assays and (2) gives the best fertilization rate following AI of heat-synchronized goats.

2.4 Material and methods

2.4.1 Chemicals

Unless otherwise specified, all products used in this experiment were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

2.4.2 Animals

The study was conducted at the Centre de Recherche en Sciences Animales de Deschambault (CRSAD, Deschambault, Canada, 46° 48' N, 71°12' E). Seven healthy, purebred Alpine bucks, 16 months old at the beginning of the study, were used. Animals were housed in collective pen in groups of 2 or 3 and were subjected to an alternating photoperiod of 6 weeks of long days (16 h light and 8 h darkness; 16 L/8 D) and 6 weeks of short days (8 L/16 D) as proposed by Delgadillo *et al.*, 1995. Daily feed was a mix of alfalfa and grass hay; minerals and water were provided *ad libitum*. Bucks were also fed a concentrate each morning until reaching a body weight of 70 kilograms. All experiments were authorized by the institutional animal care committees (both CRSAD and Université Laval) according to the guidelines of the Canadian Council on Animal Care.

Females were housed in CRSAD under photoperiodic treatment of 75 long days followed by 105 short days. A total of 35 Alpine goats with proven fertility were used for artificial inseminations. All females had a minimum of one parity.

2.4.3 Semen collection and evaluation

Semen was collected 2-3 times a week either on short or long days, using an artificial vagina and females in estrus as mounts for the bucks. Estrus was induced by estradiol injection (estradiol cypionate 1 mg/mL, Rafter 8 Products Inc., Calgary, AB) the eve of collections (Baril *et al.*, 1993). The collections were carried out over 4 months (March to July, 2010) and started on long days photoperiod cycle. The cryopreservation process was conducted on 28 ejaculates from the 7 bucks. Immediately after collection, semen was placed in a water bath maintained at 37 °C. Within 10-20 minutes after collection, the volume, sperm concentration, sperm motility, viability, and acrosome integrity were assessed. All manipulations were performed à 37°C. To determine sperm concentration, 10 µL of semen were mixed with 4 mL of sodium citrate and read by light absorbance at 550 nm with a previously calibrated spectrophotometer (Pharmacia LKB Ultraspec III, Uppsala, Sweden).

In order to assess the motility, viability and acrosome integrity, all samples were adjusted to 40×10^6 spermatozoa/mL in a phosphate saline buffer (PBS; 1.5 mM KH_2PO_4 , 8.1 mM Na_2HPO_4 , 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl) at pH 7.4 and held at 37°C. The proportion of motile sperm cells was subjectively estimated using an arbitrary scale from 0 to 5 (0 = no motility, 5 = 100 % motility) (Karatzas *et al.*, 1997) under phase contrast microscope (magnification: 400 X). Sperm live / dead ratio was assessed by eosin-nigrosin exclusion staining and phase contrast light microscopy (400 X) (Baril *et al.*, 1993). Acrosome integrity was assessed with fluorescein isothiocyanate conjugated *Pisum sativum* lectin (PSA-FITC) and fluorescence microscopy. Two hundred sperms were evaluated per slide for both eosin-nigrosin and PSA-FITC assays.

2.4.4 Semen dilution

To compare the efficacy of the two cryopreservation protocols, fresh ejaculates held in a 37°C water bath were split into two equal aliquots and one aliquot was cryopreserved using the egg yolk-based protocol (Sanchez-Partida *et al.*, 1998; Purdy, 2006a) and the second aliquot was cryopreserved using the milk-based protocol from CAPRI-AI, Mignaloux Beauvoir, France.

2.4.4.1 Egg yolk-based protocol

The egg yolk-based extender consisted of 15% egg yolk, 300 mM Tris, 28 mM glucose, 95 mM citric acid, 2% (v/v) glycerol, 1 mg/mL streptomycin sulfate, 0.06 mg/mL benzylpenicillin. Semen was extended with egg yolk extender pre-warmed to 37°C at a concentration of 500×10^6 sperm/mL. The egg yolk-extended semen was directly refrigerated and held at 4°C for 2 hours before freezing. The final concentrations of egg yolk and glycerol in the diluted semen were 15% and 2%, respectively.

2.4.4.2 Milk-based protocol

Prewarmed (37°C) buffer (10.54 mM glucose, 130 mM NaCl, 5.10 mM KCl, 9.86 mM Na_2HPO_4 , 1.33 mM MgSO_4 , 0.95 mM CaCl_2 , 1.47 mM KH_2PO_4 , pH 7.4) was added to semen for a concentration of 500×10^6 sperm/mL. Seminal plasma

was removed by two centrifugations (15 minutes, 887xg at room temperature), discarding the seminal plasma supernatant after each centrifugation.

Milk extender without glycerol (27.75 mM glucose, 0.03 mg/mL benzylpenicillin, 0.05 mg/mL streptomycin sulfate) was added to sperm pellets for a concentration of 1×10^7 sperm/mL and held at 4°C for 1 hour. Milk-extender containing 14 % glycerol was added to semen dilution in three fractions at ten minutes intervals for a final concentration of 500×10^6 sperm/mL. The extended sperm were held for 1.5 hour at 4°C before freezing. The final concentration of glycerol in the diluted semen was 7%.

2.4.5 Freezing and thawing of semen

The freezing and thawing processes of semen were the same for both the egg yolk-based and milk-based cryopreservation protocols. Extended and cooled semen was loaded into 0.25 mL French plastic straws (250 μ L; IMV, l'Aigle, France). Straws were then placed in a programmable freezer (Cell Freezer R204, Planer Products Ltd., Mississauga, Ontario). Inspired by Purdy (2006b), freezing was carried out using the following program: from 4°C to -50°C at -7 °C/min and from -50°C to -150°C at -25°C/min. When the temperature reached -150°C, the straws were stored in liquid nitrogen at -196°C. Straws were stored for at least 2 weeks before subsequent quality analyses.

Thawing was performed by submerging frozen straw in warm water (37°C) for 30 seconds. Semen was immediately diluted to 40×10^6 sperm/mL in warm PBS (37°C). Thawed semen was incubated for 2 minutes before the first analysis, called "Time 0" for all experiments.

2.4.5.1 Post-thawing analysis

Analysis of thawed sperm parameters (motility, viability, acrosomal and mitochondrial integrities) was carried out at 0, 1.5, 3, and 5 h following thawing.

Motility and progressive motility were subjected to Computer Assisted Sperm Analysis (Ceros Analyzer, with software version 12-f; Hamilton Thorne Research,

Beverly, MA). At least 200 cells from five random fields were recorded. The settings used were as follows: 60 frames acquired, frame rate of 30 Hz, minimum contrast of 60, minimum cell size of 5 pixels, VAP cut off of 21.9 μ /s, VSL cut off of 6.0 μ /s static head size of 0.5-2.5 and minimum of 200 cells from five random fields were observed for motility.

2.4.5.1.1 Flow cytometry analysis

Acrosomal and plasma membrane integrities, as well as mitochondrial polarization were conducted using flow cytometry (Guava PCA-96 Base System; l'Aigle, France; number of cells assessed per analysis: 2000; flow rate: 0.59 μ l/sec).

Sperm plasma membrane and acrosomal integrity analyses were conducted simultaneously. Membrane integrity was performed using Live / Dead® Sperm Viability kit (Gillan *et al.*, 2005) (PI 2.4 mM L7011, Invitrogen). Acrosomal integrity was performed using PNA-FITC (*Arachis hypogea* lectin FITC labeled from, L7381, Sigma, Oakville, Canada), a lectin from the peanut plant that binds to galactose moieties of the outer acrosomal membrane and reports acrosome-intact spermatozoa (Mortimer *et al.*, 1987, Gillan *et al.*, 2005).

Mitochondrial integrity analysis was performed using Guava Mitopotential test with lipophilic cationic fluorescent carbocyanine dye (JC-1; Invotrogen), which permits distinction between spermatozoa with poorly and highly functional mitochondria (Guava JC-1, Mitopotential, Assay) (Gillan *et al.*, 2005).

2.4.6 Artificial insemination

Pseudo-pregnancies were detected by ultrasound two weeks before the beginning of estrus synchronization. Goats with confirmed pseudo-pregnancy were treated with 2 injections of chlospostenol (50 μ g/dose, Estrumate, Intervet, Kirkland, Canada).

Females were subjected to an alternating photoperiod of 65 days of long days (16 h light and 8 h darkness; 16 L/8 D) and 105 days of short days (8 L/16 D). Estrus was synchronized by insertion of a controlled internal drug release dispenser (Eazi-Breed CIDR,

Pfizer, Auckland, New Zealand) composed of 3 mg of progesterone 65 days after the start of the short days (corresponding to “Day 0”). On Day 9, females were injected with 200 UI equine chorionic gonadotropin (eCG, Foligon®, Intervet, Canada) and 50 µg of cloprostenol (Estrumate, Intervet). On Day 11, CIDR were removed and estrus was detected 24, 32, and 61 h later using a teaser buck fitted with an apron. Estrus was defined as acceptance of mounting.

A single intra-cervical insemination was performed using a speculum with an attached light source 43 hours after CIDR removal on females demonstrating estrus within 32 h. Alternatively, a single intra-cervical insemination was conducted 54 h after CIDR removal on females demonstrating estrus 32 to 41 h after CIDR removal. Females that did not demonstrate estrus signs within 41 h after removal of CIDR were not inseminated and removed from the study; 2 of the 35 goats fell into this category.

Pregnancy was determined by abdominal ultrasonography performed 40 days after IA. Kidding rate was based on the birth of kids.

2.5 Experimental design

Experiment 1: Post-thaw characteristics of semen in egg yolk versus milk protocol

The objective of this experiment was to compare sperm quality following cryopreservation according to the egg yolk-based and milk-based protocols. A total of 28 ejaculates from 7 bucks were divided and processed using each protocol. One straw of each treatment per ejaculate were thawed and compared. Sperm motility, viability, acrosome integrity and mitochondrial polarization were performed on thawed semen.

Experiment 2: Fertility after intra-cervical insemination of egg yolk and milk protocol

The objective of this experiment was to extend our study beyond post-thaw sperm quality and discern the fertility of semen processed using the two cryopreservation protocols of interest. Thirty-five ejaculates collected on long day photoperiod treatment from 4 different bucks were used for artificial insemination. Ejaculates were each divided in two aliquots and cryopreserved using the egg yolk-based and milk-based protocols. Ejaculates destined

for AI were selected from those described in Experiment 1 based on similar post-thaw semen quality between the two treatments within the same ejaculate as assessed 5 min after thawing. Ultimately, four ejaculates from each of four different bucks were used. Straws were randomly assigned to goats while ensuring no inbreeding.

Thirty-five female goats were arbitrarily assigned to two experimental groups according to age, weight, daily milk production, number of lactations, date of previous kidding, prolificacy, and number of previous inseminations (all goats had been inseminated not more than once before). Goats from the first group were inseminated with semen processed using the egg yolk protocol while goats from the second group were inseminated with semen from the same ejaculates but that were cryopreserved using the milk-based technique.

2.6 Statistical analyses

Differences in semen quality due to cryopreservation protocol were determined using the Mixed procedure (PROC MIXED) of SAS 9.2 with time, treatment (cryopreservation protocol) and buck interactions as the main effects.

Differences in pregnancy and kidding rates due to semen cryopreservation protocol were analyzed using the Generalized Linear Mixed models procedure (GLIMMIX) of SAS by using a binomial distribution and the link function of logit. The model included treatment (semen cryopreservation protocol) as a fixed effect and buck as a random effect. Differences in semen quality due to cryopreservation protocol was determined using the MIXED procedure (SAS Institute Inc., 2001) with time, treatment (trt; cryopreservation protocol), buck, time \times trt and buck \times trt interactions as fixed effects. Time post-thaw was considered as repeated measures. For each semen parameter, covariance structure was objectively chosen using the Akaike information criterion (AIC). When trt \times time interaction was significant, the SLICE option of the LSMEANS statement was used to test the effect of treatment at each time. The Tukey-Kramer adjusted multiple comparisons procedure was used to compare the least squares means of the times post-thaw.

Equality of the two goat groups formed for AI between treatments was appraised in a model with treatments (cryopreservation protocol) as main effect.

2.7 Results

2.7.1 Experiment 1: Post-thaw sperm quality of semen cryopreserved using the egg yolk-based versus milk-based protocols

Fresh semen characteristics ($n = 28$) are shown in Table 2.1. Each of 28 ejaculates was frozen in milk and egg yolk extender. All semen was thawed and analyzed as described. Figure 2.2 shows significant differences between egg yolk and milk-based protocols on thawed sperm motility. Mean motile characteristics of thawed semen are presented in Table 2.2. Significant effects of the cryopreservation protocols were observed on motile characteristics of semen. Sperm motility was higher in milk-based diluents 0 and 3 h after thawing. Data also show higher sperm amplitude of lateral head displacement in milk-based diluents 0 hour post-thaw. In addition, rapid progressive motile sperm tend to be higher in milk-based diluents 3 h post-thaw ($P = 0.077$).

Table 2.3 presents the mean characteristics of membrane integrity and mitochondrial function of thawed sperm according to egg yolk or milk-based protocol. Specifically, of the two protocols, the milk-based technique resulted in higher rates of sperm membrane and mitochondrial quality between 0 and 5 h post-thaw. In this sense, the proportion of viable sperm with intact acrosomes was higher following the milk-based protocol (54.9% of viable sperm) than in egg yolk-based protocol (45.4% of viable sperm). The proportion of sperm with intact acrosomes was also higher in the milk-based protocol (38.7%) than in egg yolk-based protocol (30.8%). The proportion of viable sperm was higher in milk-based protocol 5 h post-thaw. Moreover, 1.5, 3 and 5 h post-thaw, mitochondria of sperm in milk based-protocol were less depolarised (damaged) and more polarised (functional) than sperm in egg yolk-based diluents.

Table 2.1 Characteristics of fresh semen from 7 Alpine bucks ($n = 28$ ejaculates).

Parameters	Mean	SEM
Volume (mL)	0.92	0.07
Concentration ($\times 10^9$ spz/mL)	5.3	0.35
Motility (0-5)	4.3	0.13
Viability (%)	89.8	1.34
Intact acrosomes (%)	93.2	0.84

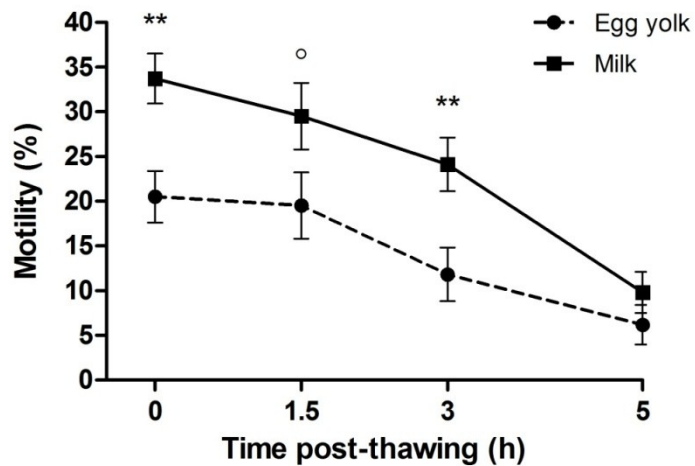
**Figure 2.1** - Motility of sperm after milk- or egg yolk-based cryopreservation protocol ($^{\circ}P < 0.10$; $**P < 0.01$).

Table 2.2 Motile characteristics (LS-means) of thawed sperm from the same ejaculates cryopreserved according to either the egg yolk-based or milk-based protocol. The milk-based cryopreservation protocol results in better sperm MS and LHD 0 h after thaw ($n = 28$ ejaculates).

Parameters	Time post-thawing (h)								SEM	<i>P</i> -value		
	0		1.5		3		5			Trt ^z	Time	Time × Trt
	Egg Yolk	Milk	Egg Yolk	Milk	Egg Yolk	Milk	Egg Yolk	Milk				
MS (%)	20.5 ^a	33.7 ^b	19.5	29.5	11.8 ^a	24.1 ^b	6.2	9.8	3.7	0.0140	< 0.0001	0.0019
RPMS (%)	9.5	10.2	7.9	12.0	3.8	7.2	1.5	1.5	1.9	0.1727	< 0.0001	0.0920
LHD (μm)	6.6 ^a	5.5 ^t	6.9	6.2	6.7	6.6	6.7	7.3	0.3	0.2384	0.0050	0.0225
BCF (Hz)	32.4	33.7	32.2	34.3	30.9	30.2	32.6	30.5	1.3	0.9176	0.0116	0.1694
LIN (%)	45.0	49.7	46.4	48.1	43.5	42.1	45.0	42.1	2.1	0.7815	0.0156	0.1787
STR (%)	74.8	78.0	76.2	78.3	74.8	74.3	74.5	74.2	1.7	0.4759	0.1175	0.5643
VAP (μm/s)	93.9	88.5	89.4	84.7	74.4	66.8	63.2	53.9	6.3	0.3048	< 0.0001	0.9427
VCL (μm/s)	157.2	141.1	151.6	141.0	118.8	120.2	115.5	100.8	9.2	0.2615	< 0.0001	0.4630
VSL (μm/s)	74.6	72.7	73.8	70.6	60.2	52.2	48.8	41.5	6.0	0.4195	< 0.0001	0.8910

MS, motile spermatozoa; RPMS, rapid progressive motile spermatozoa; LHD, amplitude of lateral head displacement; BCF, beat cross frequency; LIN, linearity; STR, straightness; VAP, velocity average path; VSL, velocity curvilinear; VSL, velocity straight line

^z Trt: Treatment (semen cryopreservation protocol)

a,b When interaction Time x Trt is significant, Trt values within time post-thaw with different superscript differ significantly ($P < 0.05$).

Table 2.3 Membrane and mitochondrial characteristics (LS-means) of thawed sperm from the same ejaculates cryopreserved according to either the egg yolk-based or milk-based protocol. The milk-based cryopreservation protocol results in better sperm parameters 3 and 5 h after thaw ($n = 28$ ejaculates).

Parameters	Time post-thaw (h)								SEM	P-value		
	0		1.5		3		5			Trt ^z	Time	Time × Trt
	Egg Yolk	Milk	Egg Yolk	Milk	Egg Yolk	Milk	Egg Yolk	Milk				
Viable with intact acrosomes (% of viable sperm)	50.0	57.9	50.1	57.4	44.7	55.1	36.7	49.4	3.6	0.0383	< 0.0001	0.4816
Total with intact acrosome (%)	34.5	41.0	34.0	41.1	30.6	38.0	24.1	34.8	2.3	0.0079	< 0.0001	0.5149
Total viable sperm (%)	32.1	35.9	32.9	34.8	30.6	31.8	21.9 ^a	29.0 ^b	2.4	0.1795	< 0.0001	0.0869
Depolarised mitochondria (%)	25.4	24.5	32.4 ^a	25.1 ^b	47.8 ^a	30.1 ^b	52.2 ^a	34.1 ^b	1.9	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001
Depolarising mitochondria (%)	14.7	11.8	14.2	11.6	25.3	22.3	22.5	17.1	1.6	< 0.0001	< 0.0001	0.7270
Polarised mitochondria (%)	60.4	63.5	49.5 ^a	64.5 ^b	20.4 ^a	44.3 ^b	24.6 ^a	48.2 ^b	2.7	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001

^z Trt: Treatment (semen cryopreservation protocol).

a,b When interaction Time x Trt is significant, Trt values within time post-thaw with different superscript differ significantly ($P < 0.05$).

2.7.2 Experiment 2: Fertility following cervical insemination with semen cryopreserved using the egg yolk-based versus milk-based protocols

2.7.2.1 Semen used for artificial insemination

Based on the post-thaw sperm analyses in Experiment 1, four ejaculates from different bucks, each cryopreserved using both egg yolk-based and milk-based techniques, were selected to test the impact of the cryopreservation process on fertility. We selected ejaculates that demonstrated the most similar characteristics between the two protocols in an effort to reduce the impact of sperm quality alone on fertility outcome.

Ejaculates used for artificial insemination had the following fresh semen characteristics: sperm volume ($1.1 \text{ mL} \pm 0.17$), sperm concentration ($4.75 \times 10^9 \text{ spz/mL} \pm 1.54$), motility ($4.5/5 \pm 0.41$), viability ($85.63\% \pm 8.44$), and intact acrosome ($91.50\% \pm 6.65$).

Motile characteristics of post-thaw selected semen for AI are shown in Table 2.4. Semen frozen in milk-based diluents had significant higher motility (37.1%) in comparison to egg yolk-based diluents (23.4%). Likewise, straightness was favourable in semen frozen in milk-based diluents. Five hours after thaw, amplitude of lateral head was higher in milk-based diluents. Beside, data show milk-based diluents tendency for better sperm rapid progressive motility 5 h post-thaw ($P = 0.10$), amplitude of lateral head displacement 1.5 h post-thaw ($P = 0.06$), linearity 1.5 and 3 h post-thaw ($P = 0.1293$ and $P = 0.0921$, respectively) and also velocity average path, velocity curvilinear and velocity straight line 0 h post-thaw ($P = 0.07$, $P = 0.06$ and $P = 0.07$, respectively).

Membrane and mitochondrial characteristics of post-thaw selected semen for IA are shown in Table 2.5. From 0 to 5 h post-thaw, the proportion of viable sperm with intact acrosomes was similar for both treatments (no significant difference). Significant differences in favour of the milk-based protocol, however, were apparent between cryopreservation treatments for the proportion of viable total sperm with intact acrosomes and total viable sperm 5 h post-thaw. The proportions of sperm with depolarised and polarised mitochondria were favourable in milk-based diluents 3 and 5 h post-thaw.

Table 2.4 Motile characteristics (LS-means) of thawed sperm from the 4 ejaculates of different bucks used for AI, each frozen according to the egg yolk-based and milk-based protocols.

Parameters	Time post-thawing (h)								SEM	P-value		
	0		1.5		3		5			Trt ^z	Time	Time × Trt
	Egg Yolk	Milk	Egg Yolk	Milk	Egg Yolk	Milk	Egg Yolk	Milk				
MS (%)	36.0	46.0	34.3	46.5	19.3	40.5	4.3	15.5	6.8	0.0219	< 0.0001	0.7025
RPMS (%)	20.3	13.0	14.0	22.4	9.3	13.8	0.0	4.5	4.3	0.3727	< 0.0001	0.1061
LHD (μm)	7.3	6.2	8.2	6.6	7.0	6.8	0.6 ^a	7.4 ^b	0.4	0.0228	< 0.0001	< 0.0001
BCF (Hz)	32.2	29.4	28.5	33.6	28.2	29.9	25.5	31.1	2.2	0.2423	0.4890	0.1029
LIN (%)	47.5	44.8	42.3	50.8	39.0	49.0	34.4	42.4	3.3	0.0785	0.1150	0.1030
STR (%)	79.3	78.0	74.8	83.3	72.3	79.3	61.4	72.0	2.7	0.0352	0.0007	0.1051
VAP (μm/s)	95.5	67.3	91.2	88.1	64.4	66.8	32.2	45.5	8.3	0.5409	< 0.0001	0.0710
VCL (μm/s)	167.3	119.3	167.9	148.4	123.7	115.2	56.2	88.4	13.0	0.2584	< 0.0001	0.0290
VSL (μm/s)	80.1	53.9	72.1	75.9	48.7	54.3	20.9	34.0	8.1	0.8799	< 0.0001	0.0594

MS, motile spermatozoa; RPMS, rapid progressive motile spermatozoa; LHD, amplitude of lateral head displacement; BCF, beat cross frequency; LIN, linearity; STR, straightness; VAP, velocity average path; VSL, velocity curvilinear; VSL, velocity straight line.

^z Trt: Treatment (semen cryopreservation protocol).

^{a,b} When interaction Time x Trt is significant, Trt values within time post-thaw with different superscript differ significantly ($P < 0.05$).

Table 2.5 Membrane and mitochondrial characteristics (LS-means) of thawed sperm from the 4 ejaculates of different bucks used for AI, each frozen according to the egg yolk-based and milk-based protocols.

Parameters	Time post-thawing (h)								SEM	<i>P</i> -value		
	0		1.5		3		5			Trt ^z	Time	Time × Trt
	Egg Yolk	Milk	Egg Yolk	Milk	Egg Yolk	Milk	Egg Yolk	Milk				
Viable with intact acrosomes (%)	70.6	73.6	70.1	73.9	70.4	73.7	50.1	69.5	5.5	0.0558	0.0409	0.1901
Total with intact acrosome (%)	45.3	45.5	45.2	47.4	44.7	45.1	25.9 ^a	43.5 ^b	3.0	0.0432	0.0001	0.0198
Total viable sperm (%)	36.5	42.5	36.8	43.9	36.2	35.5	18.4 ^a	36.3 ^b	4.0	0.0797	0.0002	0.0072
Depolarised mitochondria (%)	26.8	26.3	36.9	28.3	54.0 ^a	30.9 ^b	53.3 ^a	34.1 ^b	3.0	0.0083	0.0020	0.0079
Depolarising mitochondria (%)	15.4	14.9	17.3	19.0	32.6	29.9	34.3 ^a	17.3 ^b	2.1	0.0691	< 0.0001	< 0.0001
Polarised mitochondria (%)	57.8	58.8	48.4	55.1	18.1 ^a	43.6 ^b	23.2 ^a	54.4 ^b	4.3	0.0022	0.0015	0.0362

^z Trt: Treatment (semen cryopreservation protocol).

a,b When interaction Time × Trt is significant, Trt values within time post-thawing with different superscript differ significantly ($P < 0.05$).

2.7.2.2 Fertility

Table 2.6 shows characteristics of goat females for each group of IA with egg yolk or milk-based diluted semen. There was no significant difference between the two groups.

Ultrasound scans were performed before the synchronisation treatment to detect pseudo-pregnancy cases. None of the females showed signs of pseudo-pregnancy. Prior to insemination, the female goats were subjected to estrus synchronisation using CIDRs ($n = 35$) and 94.31% ($n = 33$) responded by showing estrus. Ultrasound scans 40 days after IA revealed one goat with pseudo-pregnancy. This goat was eliminated from the research. Ultrasound scans revealed a 42.9% pregnancy rate using semen cryopreserved with the egg yolk-based protocol ($n = 15$) and 70.1% for the milk-based protocol ($n = 17$) (Table 2.7; $P = 0.1042$). During pregnancy, one goat of egg yolk group died before kidding. This animal was excluded from the egg yolk-based diluents kidding ratio ($n = 14$).

The milk-based protocol demonstrates a tendency to yield higher kidding rates versus the egg yolk-based protocol (Table 2.7; $P = 0.0766$). The number of kids per female did not differ due to cryopreservation protocol. Table 2.8 reveals the considerable variation among ejaculates (each from different bucks) with respect to fertility rates.

Table 2.6 Variation factors of AI pregnancy rate with thawed semen in goats.

Parameters	Treatments		SEM	P-value
	Egg Yolk	Milk		
Females synchronised (n)	18	17		
Live weight (kg)	59.8	62.2	2.0	0.3805
Body condition score	3.1	3.3	0.2	0.5029
Age at AI (years)	2.9	3.1	0.3	0.6318
Number of lactations	2.2	2.2	0.2	
Anterior prolificacy	1.8	1.9	0.1	0.3152
Days in milk at AI (DIM)	229	226	16	0.9067
Milk production 305 d (kg)	814.2	843.4	35.0	0.5544

Table 2.7 Reproductive performances after AI using thawed sperm from 4 ejaculates of different bucks frozen according to the egg yolk-based and milk-based protocols (treatments).

Parameters	Treatments		SEM	P-value
	Egg Yolk	Milk		
Females inseminated (n)	15	17		
Pregnancy rate % (n)	40.0 (6/15)	70.6 (12/17)		0.0766
Kidding rate % (n)	42.9 (6/14)	70.6 (12/17)		0.1042
Kids per female	2.5	2.0	0.4	0.3555

Table 2.8 Mean pregnancy and kidding rates of 4 ejaculates from 4 bucks used for IA.

Ejaculates	Females inseminated (n)	Egg Yolk		Milk	
		Pregnancy rate % (n)	Kidding rate % (n)	Pregnancy rate % (n)	Kidding rate % (n)
1	4	50 (2/2)	100 (1/1)	0 (0/2)	0 (1/2)
2	8	0 (0/3)	0 (0/3)	60 (3/5)	60 (3/6)
3	10	20 (1/5)	20 (1/5)	100 (5/5)	100 (5/5)
4	10	80 (4/5)	80 (4/5)	80 (4/5)	80 (4/5)

2.8 Discussion

This report is the first to fully explore the efficacy of these two different goat semen cryopreservation protocols, one technique involving simple dilution with an egg yolk-based extender and the second requiring the removal of seminal plasma followed by dilution with skim milk-based diluents. Moreover, to our knowledge, this is the first study investigating the impact of cryopreservation protocol on goat semen quality up to 5 h post-thaw and on subsequent fertility using AI with estrus-synchronized females.

The goal of this research was to identify a cryopreservation method that is simple and adaptable to goat producers without a readily-available commercial source of semen or for those interested in storing semen from their own bucks. The milk-based protocol is used by the well-established goat AI industry in France (CAPRI-AI, Mignaloux Beauvoir, France). Although double centrifugation to remove seminal plasma might render this protocol less applicable for on-farm adaptation, the results in this study demonstrate the positive impact of this protocol on semen quality and fertility rate.

In support of this tendency towards better sperm fertility after cryopreservation using the milk-based protocol, many of the post-thaw semen parameters from the same treatment were better than using the egg yolk-based protocol. It is interesting to note that most of these differences become apparent several hours after thawing (Table 2.3). Since goat ovulation occurs 12 to 24 h after insemination; we aimed to evaluate semen quality several

hours post-thaw following incubation as an attempt to mimic the environment after AI. Fertility prediction according to traditional semen analysis within minutes after thawing is known to be insufficient (Amann, 1989). Moreover, although there are several reports on the impact of the freezing process and diluents components on buck sperm motility post-thaw (Sanchez-Partida *et al.*, 1998, Dorado *et al.*, 2007), they did not consider viability, acrosome integrity and mitochondria function over time as we have in the present study.

The energy requirements of sperm are remarkable; therefore, mitochondrial function is critical. In regard to sperm function, our data support the proposition that mitochondrial integrity has a direct impact on motility (Folgero *et al.*, 1993, Spiropoulos *et al.*, 2002). From 1 to 5 h post-thaw, total motility rate decreased (from 33.73 % to 9.79 % for milk-based diluents) and can be explained by increase of mitochondrial depolarization. Moreover, the importance of mitochondrial function to fertility has been demonstrated by Kasai *et al.*, (2002), who observed higher *in vitro* fertilization rates with sperm with high mitochondrial potential than with low mitochondrial potential. In our current study, the tendency towards higher fertility rates observed with milk-based cryopreservation protocol might partly be explained by higher motility 0 to 5 h post-thaw and higher polarised mitochondria 1.5 to 5 h post-thaw.

The acrosome reaction has two main functions: it enables sperm penetration through the zona pellucida and fusion with the egg plasma membrane. Spontaneous acrosome reactions prior to reaching the oocyte, however, results in sperm that are incapable of fertilizing. Here, we assayed acrosomal integrity and considered non-intact acrosomes to represent spontaneous acrosome reactions caused by freezing injury. Our data reveal that the milk-based cryopreservation technique led to the best acrosome integrity rates in live sperm 3 and 5 h after thawing, and helps explain the tendency towards the higher fertility of semen processed by this method compared to the egg yolk-based technique.

2.8.1 How might the differences between the two cryopreservation protocols influence semen quality?

It is well established that the freezing process is detrimental to semen quality (Batista, 2009). Freezing damages to sperm are mainly caused by “*cold shock*” in the range

between 15 to 35°C (Bakhach *et al.*, 2007), osmotic stress (Bever-Gilmore, 1998) and intracellular crystallization (Mazur, 1965). Milk, egg yolk and glycerol are cryoprotectants well known for their ability to reduce freezing damages (Salamon *and* Ritar 1982).

Firstly, milk's cryoprotection mechanisms are based on casein protein's fixation to spermatozoa plasma membrane (Bergeron and Manjunath, 2006). This casein fixation minimizes lipid lost and permits motility and viability conservation over the freezing process (Bergeron *et al.*, 2007). Secondly, presence of egg yolk in freezing diluents increases plasma membrane cholesterol / phospholipids' ratio (Parks *et al.*, 1981) which decreases membrane fluidity and minimise cellular lesions.

Egg yolk concentrations in freezing diluents can influence survival and acrosome integrity of goat sperm after thawing (Ritar and Salamon, 1991; Cabrera *et al.*, 2005; Burcu *et al.*, 2009). In contact with egg yolk diluents, Egg Yolk Coagulating Enzyme (EYCE), a phospholipase A₂ (PLA₂) present in goat seminal plasma, hydrolyzes phospholipids of yolk and sperm membranes, producing fatty acids and lysolecithin (Upreti *et al.*, 1999; La Falci *et al.*, 2002). Lysophospholipids are fusogenic and promote the acrosome reaction and egg membrane fusion (Yanagimachi, 1994). Although lysophospholipids in concentrations appropriate to induce the acrosome reaction are not necessarily cytotoxic to sperm (Fleming and Yanagimachi, 1981), at high concentrations, lysolecithin can be toxic (Aamdal *et al.*, 1965), presumably by favoring undesirable spontaneous acrosome reactions.

These mechanisms could explain the poor semen quality and fertility rate of egg yolk-based protocol in comparison to milk-based protocol, specifically in fewer live sperm with intact acrosome (Table 2.3). In sum, we can hypothesize that sperm membrane damage in following the egg yolk-based protocol are due not only to freezing injury, but also to large quantity of lysolecithin present after phospholipid hydrolysis. Additional experimentation, however, is required to confirm this hypothesis.

Whether or not the removal of seminal plasma is a necessity with goat semen protocols containing egg yolk remains controversial even after decades of research. On one hand, many authors have shown deterioration of semen quality after cryopreservation with seminal plasma in egg yolk diluents (Iritani and Nishikawa, 1961; Ritar and Salamon,

1982; Burcu *et al.*, 2009). On the other hand, positive effects of maintaining seminal plasma with egg yolk diluents have also been demonstrated (Chauhan and Anand, 1990; Baril *et al.*, 1993; Tuli and Holtz, 1994). In addition, washing semen to remove seminal plasma can harm sperm quality (Sanchez-Partida *et al.*, 1998; Leboeuf *et al.*, 2003). According to Cabrera (2005), the effect of egg yolk concentration in the diluents is far more important than the removal of plasma seminal on sperm cryoinjury.

In light of this controversy in the literature and our positive findings with the more complicated milk-based protocol, future experiments should consider developing cryopreservation strategies combining features from both of these techniques tested in this report. It would also be interesting to simply test the hypothesis that a lower egg yolk concentration in the diluents for the egg yolk-based technique would yield superior results to those reported here.

2.8.2 Impact of semen cryopreservation protocol on fertility

Pregnancy rates revealed a tendency of the milk-based protocol to yield more fertile semen ($P = 0.076$). These results are consistent with semen quality 0 to 5 h post-thaw. Moreover, the small sample sizes used for IA could explain why the fertility results only tended to be statistically different. Repeating such trials with a bigger flock would certainly refine our statistical results.

In addition, the data suggest variations of semen quality after thawing between bucks. Although we did not conduct such measures, we can emit the hypotheses that seminal plasma composition varies among individuals and can explain the varied responses to the cryopreservation treatments among the four bucks used for AI (Table 2.8) which highlights the importance of individual variability in semen “freezibility”.

2.9 Conclusions

In conclusion, sperm quality (motility, viability, acrosome integrity and mitochondrial polarization) between 0 and 5 h post-thaw is optimal after cryopreservation in using a milk-based protocol when compared to an egg yolk-based protocol. Interestingly, 5 h post-thaw,

some sperm membrane quality and motility parameters were favorable with the milk-based technique as opposed to with the egg yolk-based one. These data suggest that the link between the loss of sperm quality and fertility is detectable 5 h after thawing, hence highlighting the importance of observing semen quality few hours post-thaw and assessing parameters other than sperm motility. The milk-based cryopreservation technique tends to favor fertility in comparison to the egg yolk-based technique. The variability of fertility rates among bucks and our small sample size have to be considered for statistics interpretation.

We recognize that the present study is small and limited to only Alpine goats under an artificial photoperiod. Future studies should, therefore, consider these factors.

Bibliography

- Amann, R.P. 1989. Can the fertility potential of a seminal sample be predicted accurately? *J. Androl* 10 : 89-98
- Aamdal, J., O. Lyngset and K. Fossum. 1965. Toxic effect of lysolecithin on sperm. *Nord. Vet. Med.* 17: 633-639.
- Bailey, J.L., J.F. Bilodeau and N. Cormier. 2000. Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitation phenomenon. *J. Androl.* 21: 1-7.
- Bakhach, J., V. Casoli and J.C. Guimberteau. 2007. La cryopréservation de tissus composites : principe, revue de la littérature et expérience de l'équipe bordelaise. *Ann. Chir. Plas. Est.* 52: 531-547.
- Baril, G., P. Chemineau, Y. Cognie, Y. Guérin, B. Lebœuf, P. Orgeur and J.C. Vallet. 1993. Manuel de formation pour l'insémination artificielle chez les ovins et les caprins, Nouzilly.
- Bergeron, A., Y. Brindle, P. Blondin and P. Manjunath. 2007. Milk caseins decrease the binding of the major bovine seminal plasma proteins to sperm and prevent lipid loss from the sperm membrane during sperm storage. *Biol. Reprod.* 77: 120-126.
- Bergeron, A. and P. Manjunath. 2006. New insights towards understanding the mechanisms of sperm protection by egg yolk and milk. *Mol. Repr. Dev.* 73: 1338-1344.
- Bever-Gilmore, J.A. 1998. Fundamental cryobiology of mammalian spermatozoa, Purdue University, Indiana.
- Burcu, U., G. Ulgen and N. Zelariya. 2009. Effect of seminal plasma, egg yolk, and season on the freezability of Saanen buck semen. *Bull. Vet. Inst. Pulawy* 53: 369-374.
- Cabrera, F., F. González, M. Batista, P. Calero, A. Medrano and A. Gracia. 2005. The effect of removal of seminal plasma, egg yolk level and season on sperm freezability of Canary buck (*capra hircus*). *Reprod. Domest. Anim.* 40: 191-195.
- Chauhan, M.S. and S.R. Anand. 1990. Effect of egg yolk lipids on the freezing of goat semen. *Theriogenology* 34: 1003-1013.
- Cormier, N., M.A. Sirard and J.L. Bailey. 1997. Premature capacitation of bovine spermatozoa is initiated by cryopreservation. *J Androl* 18: 461-468.
- Corteel, J.M. and G. Baril. 1974. Viabilité des spermatozoïdes de boucs conservés et congelés avec ou sans leur plasma séminal: effet du glucose. *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.* 14: 741-745.

- Delgadillo, J.A., M.T. Hochereau-de Reviers, A. Daveau and P. Chemineau. 1995. Effect of short photoperiodic cycles on male genital tract and testicular parameters in male goats (*capra hircus*). *Reprod. Nutr. Dev.* 35: 58.
- Dorado, J., I. Rodríguez and M. Hidalgo. 2007. Cryopreservation of goat spermatozoa: Comparison of two freezing extenders based on post-thaw sperm quality and fertility rates after artificial insemination. *Theriogenology* 68: 168-177.
- Fleming, A.D. and R. Yanagimachi. 1981. Effects of various lipids on the acrosome reaction and fertilizing capacity of guinea pig spermatozoa with special reference to possible involvement of lysophospholipids in the acrosome reaction. *Gamete. Res.* 4: 253-273.
- Folgero, T., K. Bertheussen, S. Lindal, T. Torbergsen and P. Oian. 1993. Andrology: Mitochondrial disease and reduced sperm motility. *Hum. Reprod.* 8: 1863-1868.
- Gillan, L., G. Evans and W.M.C. Maxwell. 2005. Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. *Theriogenology* 63: 445-457.
- Iritani, A. and Y. Nishikawa. 1961. Studies on the egg-yolk coagulating enzyme in goat semen. VII. Variations in the enzyme activity of the semen between breeding season and non-breeding season, and each ejaculate collected three times successively. *Jpn. J. Anim. Reprod.* 10: 52-56.
- Iritani, A., Y. Nishikawa and S. Nagasawa. 1964. Studies on the egg-yolk coagulating enzyme in goat semen. VII. Variations in the enzyme activity of the semen between breeding season and non-breeding season, and in each ejaculate collected three times successively. *Jpn. J. Anim. Reprod.* 10: 6.
- Karatzas, G., A. Karagiannidis, S. Varsakeli and P. Brikas. 1997. Fertility of fresh and frozen-thawed goat semen during the nonbreeding season. *Theriogenology* 48: 1049-1059.
- Kasai, T., K. Ogawa, K. Mizuno, S. Nagai, Y. Uchida and S. Ohta. 2002. Relationship between sperm mitochondrial membrane potential, sperm motility and fertility potential. *Asian. J. Androl.* 4: 97-103.
- La Falci, V.S.N., H. Tortorella, J.L. Rodrigues and A. Brandelli. 2002. Seasonal variation of goat seminal plasma proteins. *Theriogenology* 57: 1035-1048.
- Lebœuf, B., B. Restall and S. Salamon. 2000. Production and storage of goat semen for artificial insemination. *Anim. Reprod. Sci.* 62: 113-141.
- Lebœuf, B., B. Restall and S. Salamon. 2003. Production et conservation de la semence de boucs pour l'insémination artificielle. *INRA Prod. Anim.* 16: 91-99.
- Mazur, P. 1965. The role of cell membranes in the freezing of yeast and other single cells. *Ann. NY. Acad. Sci.* 125: 76.

- Medeiros, C.M.O., F. Forell, A.T.D. Oliveira and J.L. Rodrigues. 2002. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? *Theriogenology* 57: 327-344.
- Mortimer, D., E.F. Curtis and J.E. Dravland. 1987. Specific labelling by peanut agglutinin of the outer acrosomal membrane of human spermatozoon. *J. Reprod. fertil.* 81: 127-135.
- Parks, J.E. and J.K. Graham. 1992. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology* 38: 209-223.
- Parks, J.E., T.N. Mecham and R.G. Saacke. 1981. Cholesterol and Phospholipids of Bovine Spermatozoa. II. Effect of Liposomes Prepared from Egg Phosphatidylcholine and Cholesterol on Sperm Cholesterol, Phospholipids, and Viability at 4°C and 37°C. *Biol. Reprod.* 24: 399-404.
- Pellicer, M.T., T. Magallon and Y. Combarrous. 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.
- Purdy, P.H. 2006a. The post-thaw quality of ram sperm held for 0 to 48h at 5°C prior to cryopreservation. *Anim. Reprod. Sci.* 93: 114-123.
- Purdy, P.H. 2006b. A review on goat sperm cryopreservation. *Small. Ruminant. Res.* 63: 215-225.
- Ritar, A.J. and S. Salamon. 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: 12.
- Ritar, A.J. and S. Salamon. 1991. Effects of month of collection, method of processing, concentration of egg yolk and duration of frozen storage on viability of Angora goat spermatozoa. *Small. Ruminant. Res.* 4: 29-37.
- Salamon, S. and A.J. Ritar. 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.
- Sanchez-Partida, L.G., B.P. Setchell and W.M.C. Maxwell. 1998. Effect of compatible solutes and diluent composition on the post-thaw motility of ram sperm. *Reprod. Fertil. Develop.* 10: 347-357.
- Spiropoulos, J., D.M. Turnbull and P.F. Chinnery. 2002. Can mitochondrial DNA mutations cause sperm dysfunction? *Mol. Hum. Reprod.* 8: 719-721.
- Tuli, R.K. and W. Holtz. 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.

- Upreti, G.C., E.L. Hall, D. Koppens, J.E. Oliver and R. Vishwanath. 1999. Studies on the measurement of phospholipase A₂ (PLA₂) and PLA₂ inhibitor activities in ram semen. *J. Anim. Reprod. Sci.* 56: 107-121.
- Watson, P.F. 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *J. Anim. Reprod. Sci.* 60-61: 481-492.
- Yanagimachi, R. 1994. Mammalian fertilization. In: *The physiology of reproduction*, 2nd edition. p. 189-317. Raven Press, New York.

Chapitre 3 : Impact de la synchronisation des chaleurs sur la fertilité des chèvres inséminées avec de la semence congelée dans un diluant à base de lait

3.1 Résumé

La pratique d'inséminations artificielles (IA) à l'aide des semences génétiquement supérieures est une stratégie connue d'amélioration de la performance des troupeaux. Chez l'espèce caprine, l'IA est souvent réalisée à un moment précis à la suite de la synchronisation des chaleurs. Cependant, relativement peu de recherches ont été menées au Québec pour connaître la différence d'efficacité des IA pratiquées sur des chèvres en chaleurs synchronisées ou non synchronisées.

Le but de cette étude est de comparer l'efficacité des IA suite à la synchronisation des chaleurs ou suite à la détection des chaleurs naturelles chez la chèvre. Pour valider l'hypothèse que ces deux processus permettent des taux de fécondité équivalents, 37 chèvres Alpines ont été inséminées à l'aide de semences congelées dans un diluant à base de lait. La synchronisation des chaleurs a été conduite par l'association entre un progestatif le CIDR (*Controlled Internal Drug Releasing device*), un analogue de prostaglandine PGF2 α et l'hormone eCG (choriogonadotropine équine).

À la suite des échographies abdominales, 67 % des chèvres du groupe *synchronisé* et 61 % des chèvres du groupe *naturel* ont été diagnostiquées gestantes. Il n'y a pas de différence de fertilité entre les deux groupes de chèvres, ce qui confirme que les IA conduites suite aux détections des chaleurs naturelles sont aussi efficaces que les IA conduites sur les chèvres en chaleurs synchronisées. Par la même occasion, cette étude confirme la fertilité de la semence de boucs congelée dans le diluant à base de lait, tel qu'étudié précédemment (Chapitre 2).

3.2 Introduction

Depuis l'apparition des techniques de cryoconservation de la semence, il y a plus de 50 ans, la compréhension des mécanismes d'actions impliqués dans ce processus de conservation

des cellules germinales s'est grandement améliorée, notamment par les nombreuses recherches effectuées sur le modèle bovin. La maîtrise de la congélation de la semence bovine coïncide directement avec l'amélioration génétique des sujets issus d'IA. Cette technique de reproduction permet l'utilisation de génétiques supérieures aux caractéristiques spécifiquement sélectionnées pour chaque production (Capgenes, 2004). L'espèce caprine ne fait pas exception à la règle. La France, un leader mondial de l'industrie caprine, a démontré que l'amélioration génétique par la pratique d'IA permet l'augmentation des volumes de production laitière des sujets ainsi que la modification dirigée de la composition du lait (Capgenes, 2004).

Pour permettre la reproduction d'un groupe de femelles à temps fixe, les IA sont jumelées aux méthodes d'induction de l'ovulation et de synchronisation des chaleurs. Le moyen le plus efficace d'obtenir la synchronisation de l'œstrus et d'ovulation est l'association entre un progestatif, un analogue de prostaglandine et l'hormone eCG (choriogonadotropine équine) (Chemineau *et al.*, 1999). Les progestatifs le plus couramment utilisés sont l'éponge FGA (« *fluogestone acetate* ») et le CIDR (« *Controlled Internal Drug Releasing device* »), deux dispositifs vaginaux qui diffusent de la progestérone et simulent la phase lutéale du cycle œstral de la chèvre. L'analogue de prostaglandine permet la rupture du corps jaune encore fonctionnel. L'eCG, autrefois appelé PMSG, « *pregnant mare's serum gonadotrophin* », est une hormone qui stimule la croissance folliculaire ovarienne, augmente la durée de l'œstrus et stimule l'ovulation chez les femelles traitées (Baril *et al.*, 1993).

L'utilisation répétée de l'eCG a pour effet de retarder, chez certaines chèvres, le moment de l'ovulation prévue. Lorsque les IA sont réalisées à temps fixe après la fin du traitement de synchronisation, la fertilité de ces chèvres est plus faible (Chemineau *et al.*, 1999). La pratique des IA sur les chèvres en chaleurs naturelles pourrait être utile aux productions caprines biologiques ou encore pour les chèvres ayant reçu plusieurs traitements hormonaux dans le passé.

En France, 82 % des IA chez la chèvre sont réalisées à la suite des synchronisations des œstrus par l'utilisation d'hormones exogènes (Ponsart *et al.*, 2004). Peu d'études ont été réalisées sur la pratique d'IA chez les chèvres sans utilisation de traitements hormonaux

(Baril *et al.*, 1993; Brice *et al.*, 2002). De plus, l'efficacité de cette méthode n'a pas été validée sur les chèvres issues d'élevages québécois. L'intégration des pratiques d'IA chez les chèvres en chaleurs naturelles dans la régie de reproduction des troupeaux, en alternance avec les techniques de synchronisation des chaleurs, permettrait à l'industrie caprine québécoise de promouvoir l'IA comme une technique de reproduction durable.

L'objectif principal de cette étude est de démontrer l'efficacité des IA chez les chèvres laitières en œstrus naturel. L'hypothèse est que la pratique d'inséminations artificielles chez la chèvre laitière en œstrus naturel ou en œstrus synchronisé permet une fertilité similaire. Par la même occasion, cette étude permettra de confirmer la fertilité de la semence de boucs congelée dans le diluant à base de lait, tel qu'étudié précédemment (Chapitre 2).

3.3 Matériels et méthodes

3.3.1 Animaux

Deux boucs adultes de race Alpine ont été logés au Centre de Recherche en Sciences Animales de Deschambault (CRSAD, Deschambault, Canada, 46° 48' -1" N, 71° 12' -1" E). Afin d'obtenir une libido et une qualité de semence optimales tout au long de l'année, les boucs étaient soumis à une photopériode continue de 6 semaines de jours courts suivie de 6 semaines de jours longs (Delgadillo *et al.*, 1991, 1993, 1995).

Trente-sept chèvres multipares de race Alpine dont la fertilité avait déjà été prouvée ont été logées au CRSAD en parc de 9 à 10 individus. Les chèvres ont été soumises à une photopériode de 75 jours longs suivie de 105 jours de jours courts. Pour tous les animaux, les jours courts étaient définis par 8 h de lumière et les jours longs par 16 h de lumière. Le protocole a été préalablement approuvé par les comités de soins des animaux du CRSAD et de l'Université Laval.

3.3.2 Récolte et analyses de la semence fraîche

La semence de chaque bouc a été récoltée 2 à 3 fois par semaine pendant un an, à l'aide d'un vagin artificiel (Minitube Canada, Ingersoll, ON) et d'une chèvre boute-en-train

en œstrus. Les œstrus ont été induits par l'injection d'œstradiol (cypionate d'œstradiol 1 mg/mL, Rafter 8 products Inc. Calgary, AB) la veille des récoltes. Les semences utilisées pour les IA ont été récoltées en période de JL du cycle de photopériode.

Immédiatement après la collecte, la semence a été placée dans un bain d'eau à 37°C. Pour déterminer la concentration spermatique, 10 µL de semence ont été dilués avec 4 mL d'une solution de citrate et ont été lus par un spectrophotomètre préalablement calibré à 550 nm d'absorbance lumineuse (Pharmacie LKB, Ultraspec III, Uppsala, Suède).

Les analyses de la semence fraîche (volume, concentration, motilité, viabilité et intégrité de l'acrosome) ont été évaluées moins de 20 minutes après la récolte. Pour ce faire, 10 µL de semence ont été dilués à une concentration de 40×10^6 spz/mL dans un tampon de phosphate conservé à 37°C (PBS; 1,5 mM KH_2PO_4 , 8,1 mM NA_2HPO_4 , 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, pH 7,4). Les manipulations des semences ont été réalisées dans une armoire chauffante à des températures de 37°C. La proportion de spermatozoïdes motiles a été évaluée subjectivement à l'aide d'une l'échelle arbitraire allant de 0 à 5 (0 = aucun déplacement des spermatozoïdes, 5 = déplacement rectiligne et rapide des spermatozoïdes) (Baril *et al.*, 1993) sous microscope à contraste de phase (grossissement : 400 X). Le ratio de spermatozoïdes morts / vivants a été déterminé par l'utilisation du colorant éosine-nigrosine (Baril *et al.*, 1993). L'intégrité de l'acrosome des spermatozoïdes a été observée grâce à la coloration au PSA (lectine de *Pisum sativum* marquée à la fluorescéine). Cette technique permet de marquer non seulement l'acrosome, mais également tout le contenu de la tête du spermatozoïde ainsi que son flagelle (Lybaert *et al.*, 2009). Deux cents spermatozoïdes ont été observés pour chaque analyse, à l'aide du microscope à contraste de phase (400 X de grossissement) pour la viabilité et à l'aide du microscope à fluorescence pour les analyses de PSA.

3.3.3 Congélation de la semence

Les tests de fertilité ont été réalisés à l'aide de semences cryoconservées selon un protocole français (CAPRI-AI, Mignaloux Beauvoir, France). L'efficacité de cette technique de cryoconservation de la semence de boucs a été démontrée une première fois

dans une précédente étude du laboratoire de fonctions spermatiques de l'Université Laval (Chapitre 2).

3.3.3.1 Dilution de la semence

Un tampon de lavage (10,54 mM glucose, 130 mM NaCl, 5,10 mM KCl, 9,86 mM Na₂HPO₄, 1,33 mM MgSO₄, 0,95 mM CaCl₂, 1,47 mM KH₂PO₄, pH 7,4) maintenu à 37°C a été ajouté à la semence fraîche pour atteindre une concentration de 500 x 10⁶ spz/mL. Le retrait du plasma séminal a été fait par deux centrifugations (15 min, 887 g à température pièce) en éliminant le surnageant entre chaque centrifugation.

Le diluant à base de lait sans glycérol a été ajouté à la semence pour atteindre une concentration de 1000 x 10⁶ spz/mL. La semence diluée a été conservée à 4°C pendant 1 h. Ensuite, le diluant à base de lait et de glycérol a été ajouté à la semence en trois fractions de 10 min d'intervalle pour une concentration finale de 500 x 10⁶ spz/mL (Baril *et al.*, 1993). La semence complètement diluée a été conservée 1,5 h à 4°C avant la congélation.

3.3.3.2 Processus de congélation

La semence a été mise en paillettes de 0,25 mL (250 µl; IMV, l'Aigle, France) dans une chambre froide à températures de 4°C. Les paillettes ont ensuite été déposées dans une machine à congélation programmable (Cell Freezer R204, Planer Products Ltd., Mississauga, ON). Inspirée du protocole de Purdy (2006b), la congélation a été réalisée en utilisant le programme suivant : de 4°C à -50°C à vitesse de -7°C/min et de -50°C à -150°C à vitesse de -25°C/min. Lorsque la température a atteint -150°C, les paillettes ont été plongées dans l'azote liquide à température de -196°C. Les paillettes ont été conservées deux semaines avant d'être analysées.

3.3.4 Décongélation et analyses de la semence

La décongélation de la semence a été faite par l'immersion des paillettes de semence dans un bain d'eau à température de 37°C pendant 30 sec. Ensuite, la semence a

été diluée à 40×10^6 spz/mL dans un PBS (37 °C). La semence a été incubée 2 min avant d'être analysée une première fois.

Les analyses de semences décongelées (motilité, viabilité, intégrité de l'acrosome et des mitochondries) ont été réalisées à 0; 1,5; 3 et 5 h d'incubation après décongélation.

Les analyses de motilité totale, progressive, vitesse tangentielle moyenne, vitesse linéaire droite, vitesse curvilinéaire, amplitude de déplacement latérale de la tête, fréquence de battement en croix, rectitude et linéarité, ont été faites à l'aide d'un microscope couplé à un ordinateur spécialisé (CASA; Ceros analyzser; avec le logiciel version 12-f; Hamilton Thorn Research, Beverly, MA, États-Unis). Au minimum, 200 cellules provenant de 5 champs sélectionnés aléatoirement ont été étudiées. Les ajustements utilisés sont les suivants : 50 cadres acquis; cadence de 50 Hz; contraste minimum de 60; taille minimum des cellules de 5 pixels; réduction de vitesse tangentielle moyenne de 21,9 μ /s; réduction de vitesse en ligne droite de 6,0 μ /s; taille de têtes statiques de 0,5-2,5.

3.3.4.1 Cytomètre en flux

La viabilité, l'intégrité de l'acrosome et des mitochondries ont été réalisées à l'aide d'un cytomètre en flux (Guava PCA-96 Base System; l'Aigle, France; nombre de cellules analysées : 2000; débit: 0,59 μ L/sec).

Les analyses de viabilité et d'intégrité de l'acrosome ont été menées en même temps. L'intégrité de la membrane plasmique a été observée à l'aide du test de viabilité (Live / DeadTM; 2,4 mM dans l'eau, L7011, Invitrogen, Carlsbad, Californie, État Unis). L'intégrité de l'acrosome a été observée à l'aide du test PNA-FITC (lectine d'*Arachis hypogea*, L7381, Sigma, Oakville, ON, Canada). L'intégrité des mitochondries a été analysée à l'aide du test Mitopotential (JC-1 dans le DMSO anhydre, Millipore, Etobicoke, ON, Canada).

3.3.5 Tests de fertilité

Toutes les femelles ont été assignées à un des deux groupes expérimentaux selon l'âge, le poids, la production laitière journalière, le nombre de lactations, le nombre de jours

en lactation, la prolificité et le nombre de synchronisations des chaleurs antécédentes (toutes les chèvres avaient un historique de deux synchronisations ou moins). Les chèvres du premier groupe (groupe *synchronisé*) ont été inséminées à temps fixe suite à la détection des chaleurs après un traitement de synchronisation des chaleurs, alors que les chèvres du deuxième groupe (groupe *naturel*) ont été inséminées à la suite des détections des chaleurs naturelles. Pour toutes les chèvres, la détection de pseudogestations a été réalisée par échographie 34 jours après le début des jours courts. Les chèvres présentant une pseudogestation ont été traitées par deux injections de 50 µg de cloprostenol (Estrumate, Intervet, Kirkland, QC) à 12 jours d'intervalle. La 2^e injection a été faite 10 jours avant le début des synchronisations pour les chèvres du groupe *synchronisé* et 21 jours avant le début des détections pour le groupe *naturel*.

3.3.5.1 Synchronisation et détection des chaleurs

Les chèvres du groupe *synchronisé* ont reçu un traitement de synchronisation et d'induction de l'ovulation (CRAAQ, 2009). La synchronisation des chaleurs a été réalisée à l'aide d'un dispositif de progestérone CIDR (Easi-Breed CIDR, Pfizer, Auckland, New Zealand) contenant 3 mg de progestérone, d'un analogue de prostaglandine (cloprosténol) et de l'hormone eCG. La pose des CIDR a été effectuée 65 jours après le début des JC pour les femelles du groupe *synchronisé* soit au « Jour 0 » du protocole de synchronisation. Au Jour 9, les femelles ont reçu une injection intramusculaire d'eCG (400 UI, Folligon®, Intervet) et une injection intramusculaire de cloprostenol (50 µg/dose, Estrumate, Intervet). Au Jour 11, les CIDR ont été retirés.

Les chaleurs ont été détectées à l'aide d'un bouc mature ayant une bonne libido et équipé d'un tablier pour empêcher l'accouplement. Les œstrus ont été définis par l'acceptation de la monte du bouc par la chèvre. Suivant le protocole français, la détection des chaleurs du groupe *synchronisé* a commencé 24 h après le retrait du CIDR (Leboeuf *et al.*, 1998). Les chèvres présentant des signes d'œstrus 24 et 32 h après le retrait du CIDR ont été inséminées 43 h après le retrait du CIDR. Les chèvres présentant un œstrus 41 h après le retrait du CIDR ont été inséminées 66 h après le retrait du CIDR. Les chèvres n'ayant pas démontré de signe d'œstrus 41 h après le retrait du CIDR n'ont pas été inséminées.

Pour le groupe *naturel*, les chaleurs ont été détectées deux fois par jour (8 h et 20 h) à partir de 70 jours après le début des jours courts, jusqu'à ce que toutes les chèvres aient démontré une chaleur. Les chèvres ont été inséminées 12 h après l'apparition des signes d'œstrus (Brice *et al.*, 2002).

3.3.5.2 Inséminations artificielles

Les inséminations artificielles intra-cervicales ont été réalisées à l'aide d'un spéculum muni d'une source lumineuse. Lorsque possible, la semence a été déposée dans le col de l'utérus sinon, la semence a été déposée dans le vagin à l'entrée du col de l'utérus. Avant chaque insémination, la paillette de semence a été décongelée pendant 30 secondes dans un bain d'eau à 37°C.

3.4 Analyses statistiques

La similitude des deux groupes de chèvres formés a été testée à l'aide d'un modèle incluant le traitement (chaleurs naturelles ou synchronisées) comme facteur principal.

Les performances de reproduction des deux groupes de chèvres ont été comparées avec la procédure GLIMMIX de SAS. Pour l'analyse du taux de conception à l'échographie et du taux de mise-bas, la distribution binomiale et la fonction « link » de « logit » ont été utilisées et le modèle incluait le traitement (chaleurs naturelles ou synchronisées) comme effet fixe et le bouc comme effet aléatoire. Pour la prolificité, la distribution multinomiale et la fonction « link » de « cumlogit » ont été utilisées et le modèle incluait le traitement (chaleurs naturelles ou synchronisées) comme effet fixe et le bouc comme effet aléatoire.

3.5 Résultats

3.5.1 Congélation de la semence

Les caractéristiques moyennes de motilité, de viabilité, d'intégrité de l'acrosome et d'intégrité des mitochondries de la semence décongelée utilisée pour les IA sont présentées dans le tableau 3.1.

Tableau 3.1 Caractéristiques moyennes (\pm écart type) de la semence décongelée utilisée pour les inséminations artificielles.

Caractéristiques	Temps d'incubation après décongélation			
	0 h	1,5 h	3 h	5 h
MS (%)	38,8 \pm 4,9	29,5 \pm 4,5	29,0 \pm 6,1	22,3 \pm 4,5
RPMS (%)	20,3 \pm 4,6	17,3 \pm 7,4	7,5 \pm 1,9	2,8 \pm 0,9
VAP (μ m/s)	99,1 \pm 1,1	108,1 \pm 18,3	70,23 \pm 4,7	57,4 \pm 2,5
VSL (μ m/s)	79,8 \pm 13,3	87,4 \pm 24,9	51,3 \pm 3,0	41,8 \pm 2,7
VCL (μ m/s)	160,2 \pm 12,5	173,8 \pm 22,3	127,6 \pm 7,3	110,2 \pm 4,3
ALH (μ m)	6,1 \pm 0,7	7,0 \pm 0,9	6,8 \pm 0,2	5,9 \pm 0,3
BCF (Hz)	34,7 \pm 2,3	29,1 \pm 3,3	26,4 \pm 0,9	26,6 \pm 2,4
STR (%)	77,0 \pm 6,4	73,8 \pm 9,8	71,5 \pm 3,9	71,0 \pm 1,5
LIN (%)	49,5 \pm 6,1	48,0 \pm 8,7	39,8 \pm 1,8	38,3 \pm 1,3
Intégrité acrosomale (%)	42,2 \pm 2,1	48,8 \pm 1,9	38,0 \pm 1,9	35,7 \pm 1,9
Viabilité (%)	57,8 \pm 1,4	58,3 \pm 0,9	53,3 \pm 2,1	51,4 \pm 2,5
% des vivants avec acrosome intact	21,0 \pm 1,7	21,1 \pm 1,9	21,8 \pm 2,0	22,1 \pm 2,6
Mitochondries polarisées (%)	15,4 \pm 1,5	8,6 \pm 1,8	6,4 \pm 1,7	6,2 \pm 0,4
Mitochondries en polarisation (%)	21,8 \pm 0,6	19,9 \pm 2,1	16,5 \pm 3,4	23,1 \pm 2,2
Mitochondries dépolarisées (%)	62,7 \pm 1,9	71,5 \pm 3,7	78,9 \pm 4,8	70,7 \pm 2,4

3.5.2 Insémination artificielle

Le tableau 3.2 présente les critères de répartition des femelles en deux groupes d'inséminations *synchronisées* et *naturelles* et la similitude entre les deux groupes. Neuf chèvres diagnostiquées pseudogestantes ont été traitées avant le commencement du projet. Suite au traitement de synchronisation des chaleurs, 15 chèvres du groupe *synchronisé* ($n = 18$) ont démontré des signes d'œstrus moins de 32 h après le retrait du

CIDR et ont été inséminées 43 h après le retrait du CIDR. De ce groupe, 3 chèvres sont entrées en œstrus 42 h après le retrait du CIDR et ont été inséminées 66 h après le retrait du CIDR.

Dix-sept jours suivant le début de la détection des chaleurs, toutes les chèvres du groupe *naturel* ($n = 19$) avaient démontré des signes d'œstrus. Une tempête de neige a rendu impossible un déplacement au CRSAD, c'est pourquoi les inséminations ont été réalisées sur 18 des 19 chèvres du groupe *naturel* 12 h après la détection des chaleurs.

Suite aux échographies abdominales, 67 % des chèvres du groupe *synchronisé* et 61 % des chèvres du groupe *naturel* ont été diagnostiquées gestantes par échographies abdominales (tableau 3.3; $P = 0,62$). Les taux de mises bas ont permis de confirmer 72 % de fertilité chez les chèvres en chaleurs synchronisées et 67 % de fertilité chez les chèvres en chaleurs naturelles ($P = 0,19$).

Tableau 3.2 Caractéristiques de chacun des groupes d'IA.

Paramètres	Traitements		SEM	Valeur <i>P</i>
	NAT	SYN		
Femelles synchronisées (n)	19	18		
Poids (kg)	59,3	59,6	2,0	0,8058
État de chair	3,2	3,2	0,1	0,9463
Nombre de lactations	2,1	2,7	0,3	0,1056
Prolificité antérieure	1,8	1,8	0,1	0,9094
Nombre de jours en lactation à l'IA	221	213	3,3	0,1043
Production laitière à 305j (kg)	930,6	1018,9	40,2	0,1249

Tableau 3.3 Relation entre la méthode d'induction des chaleurs et les taux de gestations, de mises-bas ainsi que de la taille des portées des chèvres laitières suite aux inséminations artificielles

Paramètres	Traitements		SEM	Valeur <i>P</i>
	NAT	SYN		
Femelles inséminées (n)	18	18		
Taux de gestations (%)	61,1 (11/18)	66,7 (12/18)		0,6204
Taux de mise-bas % (n)	66,7 (12/18)	72,2 (13/18)		0,6655
Taille des portées (n)	1,9	2,5	0,3	0,1875

3.6 Discussion

La présente étude démontre l'efficacité des IA à la suite de la détection des chaleurs naturelles au même titre que les IA réalisées sur des chèvres en chaleurs synchronisées. Cette étude a également permis de confirmer l'efficacité du protocole de cryoconservation à base de lait, précédemment étudié au Chapitre 2.

La pratique des IA chez la chèvre en œstrus naturel permet l'amélioration génétique des troupeaux sans contre-indication comme il est observé lors de la synchronisation des œstrus. La présente étude a également permis de confirmer l'efficacité des IA sur les chèvres en chaleurs naturelles, issues d'élevages québécois. De plus, cette technique d'insémination sans utilisation d'hormones serait applicable aux productions caprines biologiques dont les cahiers de charges interdisent la synchronisation des chaleurs par l'utilisation d'hormones exogènes.

Bien que les IA réalisées suite aux chaleurs naturelles soient moins coûteuses pour l'éleveur puisqu'elles ne requièrent pas l'achat de matériel spécialisé pour la synchronisation, elles nécessitent somme toute plus de temps et d'observation des animaux. De plus, cette pratique ne permet pas la reproduction des femelles en contre-saison (période d'anoestrus).

D'autre part, cette étude a certifié l'efficacité du protocole de congélation de la semence dans le lait. Lors de la synchronisation des chaleurs, on estime assez précisément le moment de l'ovulation de la chèvre, ce qui maximise les chances de fécondation. Sachant que la semence décongelée a une viabilité plus faible et plus rapidement périssable que la semence fraîche, il importe de faire coïncider le moment de l'insémination le plus près du moment de l'ovulation. Les chèvres en chaleurs naturelles ont été inséminées 12 h après le début de l'œstrus alors que les chèvres en chaleurs synchronisées ont été inséminées 24 h après le début des signes d'œstrus puisque leur cycle ovarien était contrôlé. Généralement, l'ovulation apparaît 28 h après le début des signes d'œstrus. Ainsi, il serait intéressant de connaître la qualité de la semence 14 h après décongélation, soit le temps approximatif passé dans le tractus femelle avant fécondation pour les chèvres en chaleurs naturelles.

Bibliographie

- Baril, G., P. Chemineau, Y. Cognie, Y. Guérin, B. Leboeuf, P. Orgeur et J.C. Vallet. 1993. Manuel de formation pour l'insémination artificielle chez les ovins et les caprins, Nouzilly.
- Brice, G., B. Leboeuf et G. Perret. 2002. Reproduction ovine et caprine sans hormones: Utopie ou perspective réaliste? Renc. Rech. Ruminants 9: 135-141.
- Capgenes. 2004. Les 10 bonnes raisons de choisir les semences de boucs améliorateurs. Dans: <http://www.capgenes.com> (ed.) No. 2010, France.
- Chemineau, P., G. Baril, B. Leboeuf, M.C. Maurel, F. Roy, M.T. Pellecer-Rubio, B. Malpaux et Y. Cognie. 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.
- CRAAQ. 2009. L'élevage de la chèvre, 439 pp.
- Delgadillo, J.A., M.T. Hochereau-de Reviere, A. Daveau et P. Chemineau. 1995. Effect of short photoperiodic cycles on male genital tract and testicular parameters in male goats (*Capra hircus*). Reprod. Nutr. Dev. 35: 58.
- Delgadillo, J.A., B. Leboeuf et P. Chemineau. 1991. Decrease in the seasonality of sexual behavior and sperm production in bucks by exposure to short photoperiodic cycles. Theriogenology 36: 755-770.
- Delgadillo, J.A., B. Leboeuf et P. Chemineau. 1993. Maintenance of sperm production in bucks during a third year of short photoperiodic cycles. Reprod. Nutr. Dev. 33: 17.
- Leboeuf, B., E. Manfredi, P. Boue, A. Piacère, G. Brice, G. Baril, C. Broqua, P. Humblot et M. Terqui. 1998. Artificial insemination of dairy goats in France. Livestock Production Science 55: 193-203.
- Lybaert, P., A. Danguy, F. Leleux, S. Meuris et P. Lebrun. 2009. Improved methodology for the detection and quantification of the acrosome reaction in mouse spermatozoa. Histol. Histopathol. 24: 999-1007.
- Ponsart, C., O. Gérard et S. Caplin. 2004. L'insémination : historique, état des lieux chez l'animal. Gynécol. Obst. Fertil. 32: 880-886.
- Purdy, P.H. 2006b. A review on goat sperm cryopreservation. Small. Ruminant. Res. 63: 215-225.

Chapitre 4 : Observation de la qualité de la semence fraîche et congelée ainsi que de la libido des boucs régis sous photopériode de 1,5 mois de cycle pendant 1 an

4.1 Introduction

Le cycle sexuel de l'espèce caprine est régi par la sécrétion de mélatonine, une hormone située dans la glande pinéale du cerveau, qui traduit l'information photopériodique (Thibault et Levasseur, 2001). Cette hormone est sécrétée uniquement en phase obscure. La variation de sécrétion de mélatonine au cours de l'année déclenche le cycle œstral des chèvres et l'activité sexuelle des boucs. On distingue les « jours courts » (JC) des « jours longs » (JL) par la longueur d'ensoleillement des journées. Ainsi, au Québec (46° 48' -1" N, 71° 12' -1" E), la période de JC a lieu du mois de septembre au mois de février lorsque la durée de la nuit augmente, et la période de JL se produit de mars à août alors que la durée de la nuit diminue. Conséquemment, l'activité sexuelle des boucs élevés au Québec est maximale en période de JC.

La régulation des phases lumineuses permet la maîtrise de la phase de reproduction de ces animaux saisonniers. Plus particulièrement, un programme de photopériode de 2 ou 4 mois de JC et JL en alternance a été élaboré par Delgadillo et son équipe (1993) pour répondre aux besoins des centres d'inséminations artificielles. Ces programmes atténuent les effets indésirables de la contre-saison sur les comportements mâles, telle la diminution de la libido et de la qualité de semence (Delgadillo *et al.*, 1995). Ils permettent ainsi la récolte et congélation de la semence de boucs tout au long de l'année.

Dans le cadre de l'étude du chapitre 2 sur la congélation de la semence de bouc, un programme de photopériode de 6 semaines de JC suivies de 6 semaines de JL a été pratiqué à la ferme. Le présent chapitre vise à décrire les observations faites sur la qualité de la semence et le comportement des boucs élevés au Québec soumis à une photopériode de 6 semaines pendant une année.

4.2 Matériels et méthodes

4.2.1 Animaux

Sept boucs adultes de race Alpine ont été logés au Centre de Recherche en Sciences Animales de Deschambault (CRSAD, Deschambault, Québec, Canada, 46° 48' -1" N, 71° 12' -1" E). Les boucs ont été soumis à une photopériode de 6 semaines de JC suivies de 6 semaines de JL (Delgadillo *et al.*, 1991, 1993, 1995) pendant 14 mois. La durée des cycles journaliers était de 8 h de lumière en période de JC et 16 h de lumière en période de JL. La photopériode a été mise en place 2 mois avant le début des récoltes. Le tableau 4.1 présente le calendrier de photopériode utilisé.

Tableau 4.1 Calendrier du cycle de photopériode

Type de photopériode	Durée
Jours longs	15 septembre – 31 octobre
	15 décembre – 31 janvier
	15 mars – 30 avril
	13 juin – 25 juillet
Jours courts	1 novembre – 14 décembre
	1 février – 14 mars
	1 mai – 12 juin
	26 juillet – 6 septembre

4.2.2 Évaluation de l'activité sexuelle

4.2.2.1 Libido

Lors des activités de récolte de semence, la réussite du bouc à éjaculer en présence d'une chèvre boute-en-train en œstrus, et ce, en moins de 3 minutes a été qualifiée de « 1 ». En dehors de ces conditions, l'échec à l'éjaculation a été qualifié « 0 » (Delgadillo *et al.*, 1991).

4.2.2.2 Circonférence scrotale

La circonférence scrotale des boucs a été mesurée à l'aide d'un ruban à mesurer (Walken-Brown *et al.*, 1994). Neuf mesures de circonférences scrotales ont été prises pendant l'année.

4.2.3 Récolte et analyses de la semence fraîche

La semence a été récoltée de 1 à 4 fois par semaine en période de JC et de JL pendant un an. La collecte de la semence s'est effectuée à l'aide d'un vagin artificiel (Minitube Canada, Ingersoll, ON) et d'une chèvre boute-en-train en œstrus. Les œstrus ont été induits par l'injection d'œstradiol (cypionate d'œstradiol 1 mg/mL, Rafter 8 products Inc. Calgary, AB) la veille des récoltes.

Immédiatement après la collecte, les tubes de semences ont été placés dans un bain d'eau à 37°C. Pour déterminer la concentration spermatique, 10 µL de semence ont été mélangés avec 4 mL d'une solution de citrate et ont été lus par un spectrophotomètre préalablement calibré à 550 nm d'absorbance lumineuse (Pharmacie LKB, Ultraspec III, Uppsala, Suède).

Les analyses de la semence fraîche (volume, concentration, motilité, viabilité et intégrité de l'acrosome) ont été faites moins de 20 minutes après la récolte. Pour ce faire, 10 µL de semence ont été dilués à une concentration de 40×10^6 spz/mL dans un tampon de phosphate conservé à 37°C (PBS; 1,5 mM KH_2PO_4 , 8,1 mM NA_2HPO_4 , 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, pH 7,4). Les manipulations des semences ont été réalisées à des températures de 37°C. La motilité de la semence a été évaluée subjectivement à l'aide d'une échelle arbitraire allant de 0 à 5 (0 = aucun déplacement des spermatozoïdes, 5 = déplacement rectiligne et rapide des spermatozoïdes) (Baril *et al.*, 1993) sous microscope à contraste de phase (grossissement : 400 X). Le ratio de spermatozoïdes morts / vivants a été déterminé par l'utilisation du colorant éosine-nigrosine (Baril *et al.*, 1993). L'intégrité de l'acrosome des spermatozoïdes a été observée grâce à la coloration au PSA (lectine de *Pisum sativum* marquée à la fluorescéine). Cette technique permet de marquer non seulement l'acrosome, mais également tout le contenu de la tête du spermatozoïde ainsi que son flagelle (Lybaert

et al., 2009). Deux cents spermatozoïdes ont été observés pour chaque analyse; à l'aide du microscope à contraste de phase (400 X de grossissement) pour la viabilité et à l'aide du microscope à fluorescence pour les analyses de PSA.

4.2.4 Congélation de la semence

La congélation de la semence a été réalisée suivant un protocole de congélation à base de jaune d'œuf (15 %), de Tris et de glucose (Sanchez-Partida *et al.*, 1998; Purdy, 2006a). La concentration finale de la semence mise en paillettes était de 500×10^6 spz/mL. Les paillettes de 0,25 µl (IMV, l'Aigle, France) de semence ont été congelées à l'aide d'un appareil automatique programmable (Cell Freezer R204, Planer Productes Ltd., Mississauga, Ontario). Inspiré du protocole de congélation de Purdy (2006b), le programme de congélation était le suivant : de 4°C à -50°C (-7°C/min), et de -50°C à -150°C (-25°C/min). Lorsque la température atteignait -150°C, les paillettes étaient plongées dans un réservoir d'azote liquide à -196°C. Les paillettes ont été conservées au minimum 2 semaines avant d'être analysées.

4.2.5 Décongélation et analyses de la semence

La décongélation des semences a été réalisée en submergeant les paillettes congelées dans de l'eau chaude (37°C) pendant 30 secondes. La semence a été immédiatement diluée à une concentration de 40×10^6 spz/mL dans une solution de PBS chaude (37°C). La semence décongelée a été incubée pendant 2 minutes avant les premières analyses appelées « Temps 0 » pour toutes les expériences. Les analyses des semences décongelées (motilité, viabilité, intégrité de l'acrosome et des mitochondries) ont été réalisées à 0, 1,5, 3 et 5 heures d'incubation à 37°C après décongélation.

Les analyses de la motilité totale et progressive ont été faites à l'aide d'un ordinateur spécialisé (CASA; Ceros Analyzer; avec le logiciel version 12-f; Hamilton Thorn Research, Beverly, MA, États-Unis). Au minimum, 200 cellules provenant de 5 champs sélectionnées aléatoirement ont été étudiées. Les ajustements utilisés sont les suivants : 50 cadres acquis; cadence de 50 Hz; contraste minimum de 60; taille minimum

des cellules de 5 pixels; réduction de vitesse tangentielle moyenne de 21,9 μ /s; réduction de vitesse en ligne droite de 6,0 μ /s; taille de têtes statiques de 0,5-2,5.

4.2.5.1 Cytomètre en flux

La viabilité et l'intégrité de l'acrosome ont été réalisées à l'aide d'un cytomètre en flux (Guava PCA-96 Base System; l'Aigle, France; nombre de cellules analysées : 2000; débit : 0,59 μ L/sec).

Les analyses de viabilité et d'intégrité de l'acrosome ont été menées en même temps. L'intégrité de la membrane plasmique a été observée à l'aide du test de viabilité (Live / DeathTM; 2,4 mM dans l'eau, L7011, Invitrogen, Carlsbad, Californie, États-Unis). L'intégrité de l'acrosome a été observée à l'aide du test PNA-FITC (lectine d'*Arachis hypogea*, L7381, Sigma, ON, Canada).

4.3 Résultats

4.3.1 Activité sexuelle

4.3.1.1 Libido

Au total, 102 tests d'éjaculation pour chacun des 7 boucs ont été réalisés de septembre 2009 à août 2010. La moyenne de réussite à l'éjaculation sur une période de 1 an a été de 83,6 % (\pm 12,4 %). La réussite aux tests d'éjaculation varie de 63,7 % à 96,1 % selon les boucs.

4.3.1.2 Circonférence scrotale

Au total, 64 mesures de circonférences scrotales ont été prises tout au long de l'année. La circonférence scrotale moyenne des boucs a été de 30,84 cm (\pm 2,34 cm). La moyenne de circonférence scrotale annuelle pour chaque bouc varie de 28,58 à 32,11 cm. Pendant l'année les mesures de circonférences scrotales ont varié de 24,9 à 35,6 cm selon les boucs.

4.3.2 Qualité de semence

4.3.2.1 Semence fraîche

La variation du volume, de la concentration et de la viabilité de la semence fraîche tout au long de l'année est illustrée dans la figure 4.1. La baisse de qualité spermatique aux mois d'août et septembre 2010 coïncide avec une piètre qualité de récolte et à l'absence de chaleurs chez les chèvres boute-en-train. La qualité de la semence fraîche varie beaucoup selon les boucs et ne présente pas de schéma clair entre les JC et les JL tout au long de l'année. Le tableau 4.1 expose les caractéristiques de semence fraîche, observées tout au long de l'année.

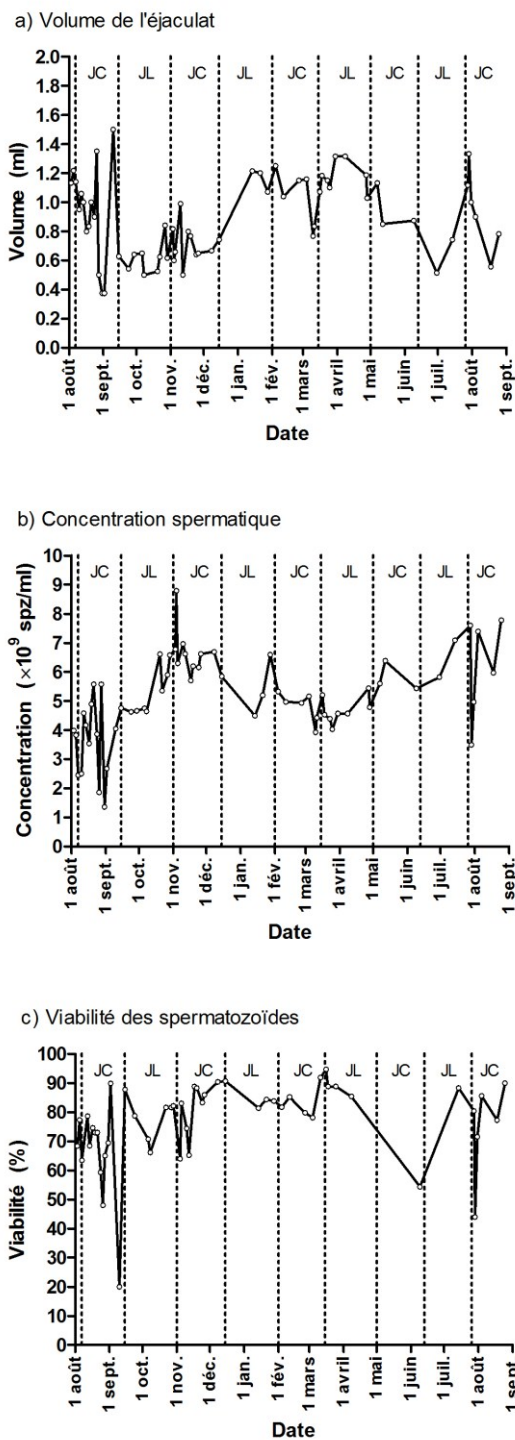


Figure 4.1 - Variation du volume, de la concentration spermatique et de la viabilité moyenne des spermatozoïdes de la semence fraîche de boucs tout au long de l'année. Les boucs étaient soumis à une photopériode de 6 semaines de JC suivies de 6 semaines de JL.

Tableau 4.2 Caractéristiques de la semence fraîche des boucs sous photopériode de 6 semaines de JC et de JL consécutives pendant 1 an ($n = 596$ éjaculats).

Caractéristique de la semence fraîche	Minimums observés	Maximums observés	Moyennes annuelles tous boucs confondus
Volume (mL)	0,10	2,80	0,89 ± 0,45
Concentration (spz x 10 ⁹)	0,39	11,37	5,7 ± 1,81
Motilité (0 à 5)	3,9/5	0/5	5/5 ± 0,96/5
Viabilité (%)	15,5	99,5	79,41 ± 15,54

4.3.2.2 Semence décongelée

Cinquante-huit éjaculats ont été congelée du mois de novembre 2009 au mois de juillet 2010. La motilité, viabilité et l'intégrité de l'acrosome de la semence décongelée et incubée pendant 5 h est présentée à la figure 4.2. Tel qu'observé pour la semence fraîche, la qualité de semence décongelée diffère grandement entre les boucs.

Variation de la motilité, viabilité et intégrité de l'acrosome de la semence de boucs 5 h après décongélation selon la période de congélation

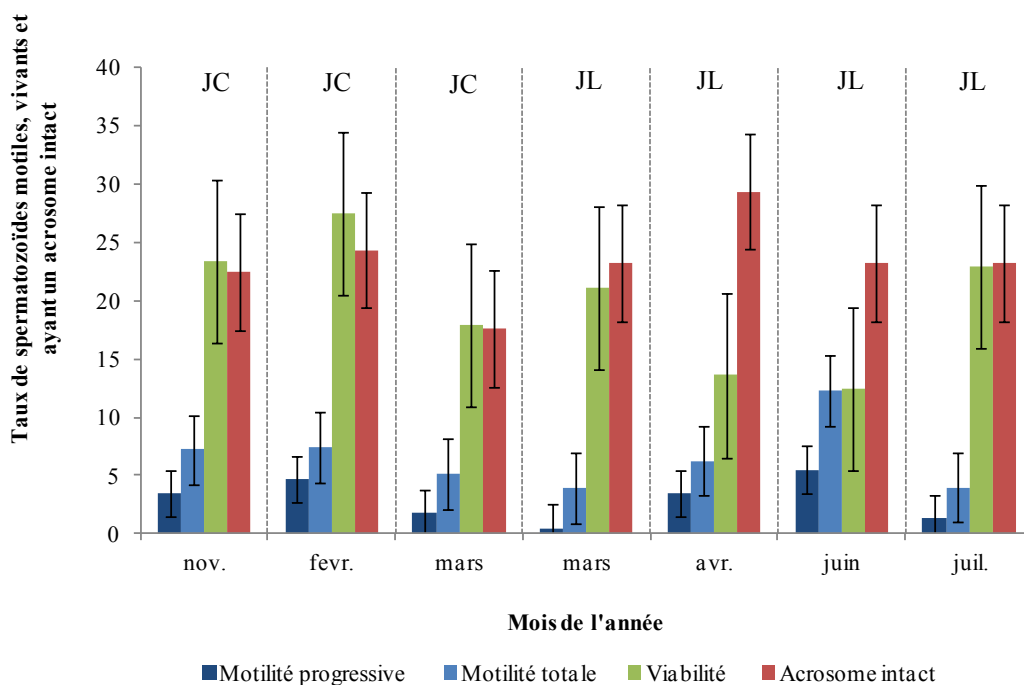


Figure 4.2 - Variation de la qualité de la semence de bouc 5 h après décongélation selon la période de congélation. Les boucs étaient soumis à une photopériode de 6 semaines de JC suivies de 6 semaines de JL.

4.4 Discussion

En conditions NAT, l'activité sexuelle et la qualité de la semence des boucs originaires des latitudes tempérées sont grandement influencées par les saisons. Plusieurs études rapportent que l'utilisation d'une photopériode de 2 ou 4 mois de cycle, c'est-à-dire 2 ou 4 mois de JC suivis de 2 ou 4 mois de JL sur une période de 1 à 3 ans, permet de stabiliser la qualité de la semence de boucs comparativement au cycle naturel de lumière (Delgadillo *et al.*, 1993; Leboeuf *et al.*, 2004). Le présent chapitre a permis de caractériser la qualité de la semence fraîche et décongelée des boucs issus d'élevages québécois soumis à une photopériode de 6 semaines de JL suivies de 6 semaines de JC pendant 1 an.

4.4.1 Processus

En période de JC, l'augmentation de la production de mélatonine stimule la sécrétion pulsatile de la *GnRH* qui induit la sécrétion de *FSH* et de *LH* dans le cerveau. La *LH* joue un rôle indispensable dans le démarrage de la spermatogenèse et sa pulsation contrôle directement la production de testostérone par les cellules de Leydig des testicules. De son côté, la testostérone joue un rôle clé dans le soutien de la spermatogénèse, via les cellules de Sertoli, sous l'action de la *FSH*, particulièrement sur la division finale des spermatogonies. La testostérone permet, entre autres, l'apparition et le maintien des caractères sexuels secondaires telles la pilosité, la croissance musculaire et les pulsions sexuelles.

4.4.2 Conditions naturelles

En période de JL ou de repos sexuel, la production de mélatonine, de *LH* et de testostérone diminue. La libido et la production spermatique du bouc sont alors moins favorables à la reproduction (Delgadillo *et al.*, 1991; Karagiannidis *et al.*, 2000). À l'inverse, en période de JC, une concentration plasmiq ue élevée en mélatonine accroît les niveaux de *LH* et de testostérone de l'organisme (Chemineau *et al.*, 1986), ce qui favorise la libido et la production spermatique.

Chez le mâle adulte, la motivation et l'efficacité sexuelle dépendent à la fois des sécrétions hormonales et des relations sociales entre les animaux (Leboeuf *et al.*, 2003). En conditions de luminosité naturelle (NAT), l'arrivée des JL diminue fortement l'activité sexuelle des boucs. Le poids et la taille des testicules sont très variables en conditions NAT, passant de faible, en JC, pour atteindre un volume maximal en JL (Delgadillo *et al.*, 1991). La semence des boucs est également sujette à des variations de motilité et de viabilité des spermatozoïdes. Les études ont observé des motilités globales et progressives des spermatozoïdes significativement plus élevées en période de reproduction (JC) qu'en contre-saison (JL) (Tuli et Holtz, 1995; Karagiannidis *et al.*, 2000).

4.5 Conclusions

Les observations du présent chapitre ont permis d'évaluer les caractéristiques de la semence fraîche et congelée des boucs issus de troupeaux québécois. L'utilisation d'une telle régie de photopériode adaptée aux boucs pourrait être bénéfique à certains troupeaux puisqu'elle permet la stabilisation de la libido et de la qualité de semence tout au long de l'année. Cette pratique pourrait être jumelée aux techniques d'accouplement en contre-saison par exemple.

Bibliographie

- Baril, G., P. Chemineau, Y. Cognie, Y. Guérin, B. Leboeuf, P. Orgeur et J.C. Vallet. 1993. Manuel de formation pour l'insémination artificielle chez les ovins et les caprins, Nouzilly.
- Chemineau, P., E. Normant, J.P. Ravault et J. Thimonier. 1986. Induction and persistence of pituitary and ovarian activity in the out-of-season lactating dairy goat after a treatment combining a skeleton photoperiod, melatonin and the male effect. *J Reprod Fertil* 78: 497-504.
- Delgadillo, J.A., M.T. Hochereau-de Reviere, A. Daveau et P. Chemineau. 1995. Effect of short photoperiodic cycles on male genital tract and testicular parameters in male goats (*Capra hircus*). *Reprod. Nutr. Dev.* 35: 58.
- Delgadillo, J.A., B. Leboeuf et P. Chemineau. 1991. Decrease in the seasonality of sexual behavior and sperm production in bucks by exposure to short photoperiodic cycles. *Theriogenology* 36: 755-770.
- Delgadillo, J.A., B. Leboeuf et P. Chemineau. 1993. Maintenance of sperm production in bucks during a third year of short photoperiodic cycles. *Reprod. Nutr. Dev.* 33: 17.
- Karagiannidis, A., S. Varsakeli et G. Karatzas. 2000. Characteristics and seasonal variations in the semen of Alpine, Saanen and Damascus goat bucks born and raised in Greece. *Theriogenology* 53: 1285-1293.
- Leboeuf, B., V. Furstoss, P. Guillouet et P. Boué. 2004. Production on semen for artificial insemination from Alpine and Saanen bucks under different photoperiodic cycles. *S. Afr. J. Anim. Sci.* 34: 230-232.
- Leboeuf, B., B. Restall et S. Salamon. 2003. Production et conservation de la semence de bouc pour l'insémination artificielle. *INRA Prod. Anim.* 16: 91-99.
- Lybaert, P., A. Danguy, F. Leleux, S. Meuris et P. Lebrun. 2009. Improved methodology for the detection and quantification of the acrosome reaction in mouse spermatozoa. *Histol. Histopathol.* 24: 999-1007.
- Purdy, P.H. 2006a. The post-thaw quality of ram sperm held for 0 to 48h at 5°C prior to cryopreservation. *Anim. Reprod. Sci.* 93: 114-123.
- Purdy, P.H. 2006b. A review on goat sperm cryopreservation. *Small. Ruminant. Res.* 63: 215-225.
- Sanchez-Partida, L.G., B.P. Setchell et W.M.C. Maxwell. 1998. Effect of compatible solutes and diluent composition on the post-thaw motility of ram sperm. *Reprod. Fertil. Develop.* 10: 347-357.
- Thibault, C. et M.C. Levasseur. 2001. La reproduction chez les mammifères et l'homme. Ellipses éd, Paris, 928 pp.

Tuli, R.K. et W. Holtz. 1995. Effect of season on the freezability of Boer goat semen in the northern temperate zone. *Theriogenology* 43: 1359-1363.

Chapitre 5 : Conclusions générales

5.1 Nouvelles découvertes issues de ce travail de maîtrise

Les objectifs du projet de cryoconservation de la semence de boucs sont atteints. Nous avons évalué la qualité de la semence décongelée et son pouvoir fécondant selon les deux protocoles de congélation. Toutefois, la comparaison directe des deux diluants de semence (jaune d'œuf et lait) est délicate, puisque chaque protocole utilise des ingrédients et des procédés différents. Les résultats confirment que le protocole à base de lait permet une meilleure qualité de la semence décongelée que le protocole à base de jaune d'œuf. 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. Or, le protocole étudié contient 15 % de jaune d'œuf. La faible qualité de la semence après décongélation dans le jaune d'œuf pourrait s'expliquer ainsi.

Bien que les taux de fertilité obtenus suite aux IA soient semblables à ceux observés dans l'industrie caprine, la pratique des IA sur un plus grand nombre de femelles aurait sans doute permis de raffiner les résultats de fertilité liés aux techniques de congélation de la semence.

D'autre part, les objectifs du projet de détection des chaleurs synchronisées et naturelles ont été atteints. Nous avons su démontrer l'efficacité des IA chez les chèvres en chaleurs naturelles au même titre que les chèvres en chaleurs synchronisées. Par le fait même, nous avons pu confirmer, de façon indirecte, le pouvoir fécondant de la semence congelée selon le protocole à base de lait.

En ce qui a trait aux traitements photopériodiques de cycles courts, cette étude se limite à décrire les observations faites sur la qualité de la semence et le comportement des boucs soumis à une photopériode de 6 semaines. Sans comparaison à un groupe témoin en conditions de luminosité NAT, l'interprétation des données reste limitée. Puisque très peu d'informations sont disponibles au sujet de la qualité de la semence des boucs issus

d'élevages québécois, les observations de ce projet contribuent à l'avancement des connaissances à ce sujet.

5.2 Recommandations à l'industrie québécoise

Le transfert des connaissances accumulées lors de la réalisation de ce travail est souhaitable afin de promouvoir les techniques de reproduction étudiées. Les techniques de cryoconservation de la semence de boucs devraient privilégier autant que possible l'utilisation du protocole à base de lait pour maximiser la qualité de la semence et la fertilité. Lors de congélation de semences à la ferme, l'utilisation du protocole à base de jaune d'œuf serait plus facilement applicable, mais l'utilisation du protocole à base de lait, bien qu'un peu plus complexe, serait plus profitable. La congélation à la ferme donnerait l'opportunité aux éleveurs de conserver la génétique d'un animal de valeur ou d'un animal en copropriété.

D'un autre côté, l'application d'une régie de photopériodes de 2 ou 4 mois de JC et de JL successifs est destinée aux mâles reproducteurs dont la libido et la semence de bonne qualité sont sollicitées toute l'année. L'utilisation d'une telle photopériode pourrait, par exemple, être jumelée aux techniques de synchronisation des chaleurs chez la chèvre. La mise en reproduction par saillies naturelles des femelles synchronisées en période de JL serait optimisée si elle était jumelée à des mâles reproducteurs soumis à une courte photopériode.

5.3 Directions futures

L'influence du plasma séminal, de la glycérolisation et de la concentration des cryoprotectants (jaune d'œuf, lait, glycérol) sur la qualité de la semence décongelée n'est pas négligeable. Il serait utile de comparer chaque étape de ces deux protocoles. Dans le même ordre d'idées, des études vouées à l'amélioration des protocoles de congélation de la semence pourront être réalisées notamment, l'optimisation du protocole à base de lait par l'addition de cholestérol.

En ce qui concerne les caractères saisonniers des boucs, il serait intéressant, dans un premier temps, de documenter la qualité de la semence et les comportements sexuels en conditions naturelles au Québec. Dans un deuxième temps, la comparaison entre la régie de photopériode de 6 semaines et les conditions naturelles permettrait d'approfondir les hypothèses de recherche soulevées dans la présente étude.

Puisque la fertilité des techniques d'IA en chaleurs naturelles ou synchronisées permet des taux de fertilité équivalents, l'alternance de ces pratiques pourra être incorporée dans la régie de reproduction des chèvres afin de minimiser le développement d'anticorps anti-eCG tout en valorisant la pratique des IA.

Au niveau de l'efficacité de la production laitière, il serait intéressant de mettre sur pied un canevas de reproduction qui jumellerait les techniques de photopériode, de détection des chaleurs synchronisées et des chaleurs naturelle afin d'optimiser la pratique des accouplements et des IA tout au long de l'année.

Enfin, l'efficacité des techniques apprises dans ce mémoire devrait être validée par des études en milieux commerciaux. La présente étude s'est attardée exclusivement à la race Alpine. L'adaptation des techniques de congélation de la semence et de synchronisation des chaleurs sur différentes races caprines pourrait également faire l'objet d'une étude terrain.