



HAL
open science

Traitement lumineux et reproduction caprine

Marion Estrade

► **To cite this version:**

Marion Estrade. Traitement lumineux et reproduction caprine : Assurer une reproduction régulière de semence pour l'insémination caprine au cours de l'année. Sciences agricoles. 2018. hal-02787743

HAL Id: hal-02787743

<https://hal.inrae.fr/hal-02787743>

Submitted on 5 Jun 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - NoDerivatives 4.0 International License

MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

Traitements lumineux et reproduction caprine

—

**Assurer une production régulière de semence pour
l'insémination caprine au cours de l'année**

Présenté par : **Marion ESTRADE**

Pour la spécialité : Elevages et filières Durables et iNnovants (EDEN)

Stage effectué : du 06/03/2018 au 05/09/2018

Lieu : INRA, Centre de ROUILLE, UE FERlus, équipe FERTICAP

Pour l'obtention du :

DIPLÔME D'INGÉNIEUR AGROPARISTECH

Enseignant-tuteur responsable de stage : Pierre CALVEL, Maître de Conférences,
Biologie de la Reproduction (AGROPARISTECH)

Maître de stage : Alice FATET, animatrice scientifique du programme Reproduction
Caprine Innovante (INRA)

Soutenu le : 18/09/2018

RÉSUMÉ

Les caprins sont une espèce à reproduction saisonnée. C'est la sécrétion de mélatonine, qui dépend des variations de la durée du jour au cours de l'année, qui régule ces périodes d'activité et de repos sexuels. Chez les boucs de centre d'insémination, la qualité et la quantité de semence dépendent du rythme photopériodique auquel ils sont soumis. Au cours du processus de préparation des doses d'insémination, la semence doit subir un lavage du plasma séminal car la présence de BUSgp60, lipase sécrétée par les glandes bulbo-urétrales, a un effet délétère sur la conservation des spermatozoïdes. Cette étape de lavage est coûteuse (temps, consommables, rendement de production), une alternative a été étudiée dans l'expérience 1. Les sécrétions des glandes annexes étant régulées par la testostérone, dont le niveau plasmatique varie selon la photopériode, la possibilité d'utiliser les traitements photopériodiques pour moduler la sécrétion de BUSgp60 a été explorée, dans l'idée de supprimer cette étape de lavage. Un suivi de la qualité de la semence lavée ou non, de la testostéronémie et de l'activité a été réalisé sur trois lots de boucs : un lot A exposé à une alternance 45JL/45JC, un lot B exposé à une alternance 60JL/60JC et un lot témoin sous lumière naturelle. L'activité lipase a été significativement réduite dans la semence du lot A et une faible variation du rendement de congélation entre semence lavée et non lavée a été observée. Mais les résultats ne permettent pas de conclure que le rythme 45JL/45JC permettrait de supprimer l'étape de lavage ou d'assurer un meilleur rendement de production. S'il est possible de piloter la production de semence des boucs grâce aux traitements photopériodiques, les modalités d'éclairages nécessaires n'ont jamais été étudiées. L'objet de l'expérience 2 sera de déterminer le domaine de longueurs d'onde et l'intensité « utiles » au contrôle de la sécrétion de mélatonine. À défaut d'avoir pu réaliser la phase pratique sur animaux, les résultats préliminaires d'acquisitions spectrales ont permis d'établir pour la suite de l'expérience les conditions d'éclairage précises permettant d'obtenir les intensités (200, 70 et 10 lux) et les gammes du spectre souhaitées de 450 +/- 25nm et 620 +/- 10nm.

REMERCIEMENTS

À Alice FATET, pour m'avoir accueillie de manière plutôt « gonflée », pour sa pédagogie, pour son humour, sa simplicité mais également pour sa disponibilité malgré son planning de ministre. La secrétaire a parfois eu du mal à suivre.

À Pierre CALVEL, enseignant qui a réussi à me supporter et me conseiller depuis mon entrée au sein d'Agroparistech en 2015. Je vous dis un grand MERCI pour votre suivi.

À Geneviève PIERRE, pour son oreille attentive, pour ses conseils avisés, pour nos pauses thé, pour nos rigolades.

À Karine BOISSARD, pour son aide et pour nos conversations aussi sérieuses que pleines d'humour.

À Emilie WEYERS, pour m'avoir permis d'aller sur le terrain chez les éleveurs et connaître les bases du métier d'inséminatrice. Pour sa bonne humeur et sa sympathie.

À Benjamin ROUET, pour nos conversations toujours très pertinentes, pour sa participation à l'atelier collage-découpage de filtres, sa formation express pour la collecte de semence et pour m'avoir appris à passer le balais correctement.

À Florence BORDERES, pour sa franchise et sa générosité.

À Evelyne BRUNETEAU, pour sa bonne humeur quotidienne.

À l'équipe porcine, pour ces moments de détente.

À Virginie LEFOUL, stagiaire « cochon » et colocataire, pour ses quelques mois de fous rires.

À Elodie Chaillou, Didier COMBES, Sandrine Freret, Maria PELLICER-RUBIO, Eric ROY, pour leur implication et leur aide précieuse au cours de ces six mois.

À tous, j'espère que vous ferez perdurer la tradition des pique-niques.

Et enfin, à Marion et Maude, qui ont fait de ma dernière année scolaire un EDEN.

SOMMAIRE

INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	7
I. ETAT DE L'ART.....	9
I.A. PHOTOPERIODE ET ACTIVITE SEXUELLE CHEZ LES CAPRINS	9
I.A.1. <i>Transmission de la lumière : de sa perception aux cascades biochimiques</i>	10
I.A.2. <i>Effets des signaux lumineux sur le cycle reproducteur</i>	12
I.A.3. <i>Traitements photopériodiques de préparation à la reproduction : problématiques actuelles de la mise en œuvre en élevage</i>	13
I.B. INSEMINATION ET PRODUCTION DE SEMENCE EN CENTRE D'INSEMINATION ARTIFICIELLE CAPRIN	14
I.B.1. <i>Utilisation de la semence de boucs en IA : avantages et inconvénients</i>	15
I.B.2. <i>Identification de la glycoprotéine responsable de la dégradation de la qualité de la semence</i>	16
I.B.3. <i>Lavage de la semence : étape actuellement cruciale pour une bonne qualité de semence après congélation</i>	17
I.B.4. <i>Méthodes alternatives proposées au lavage de la semence</i>	18
I.B.5. <i>Effets de différents rythmes photopériodiques artificiels sur la production de semence</i>	19
II. MATÉRIELS ET MÉTHODES	22
II. A. EXPERIENCE 1 : ÉTUDE DE DIFFERENTS TRAITEMENTS LUMINEUX SUR LA SEMENCE CAPRINE	22
II.A.1. <i>Contexte du protocole</i>	22
II.A.2. <i>Objectif du protocole</i>	23
II.A.3. <i>Protocole expérimental</i>	23
II. B. EXPERIENCE 2 : CARACTERISATION DE LA PART DU SPECTRE LUMINEUX UTILE A LA SECRETION DE MELATONINE	24
II.B.1. <i>Définitions autour de la lumière</i>	24
II.B.2. <i>Construction du protocole expérimental</i>	25
II.B.2.1. <i>Choix des boucs utilisés</i>	25
II.B.2.2. <i>Bandes spectrales et intensités testées</i>	26
II.B.2.3. <i>Paramètres testés et fréquences des prélèvements</i>	27
II.B.2.4. <i>Bâtiment et installations lumineuses</i>	28
II.B.2.5. <i>Bien-être animal et questions éthiques</i>	30
III. RÉSULTATS	32
III.A. RESULTATS DE L'EXPERIENCE 1	32
III.A.1. <i>Testostéronémie</i>	32
III.A.2. <i>Activité lipase</i>	33
III.A.3. <i>Evolution conjointe de la testostéronémie et de l'activité lipase</i>	34
III.A.4. <i>Qualité de la semence</i>	36
III.A.4.1. <i>Mobilité des spermatozoïdes</i>	38
III.A.4.2. <i>Motilité des spermatozoïdes</i>	40
III.A.4.3. <i>Nombre de spermatozoïdes dans la semence</i>	42
III.A.4.4. <i>Volume et concentration de la semence</i>	43
III.A.4.5. <i>Rendement de congélation</i>	43
III. B. RESULTATS DE L'EXPERIENCE 2	45
III.B.1. <i>Caractérisation de l'éclairage blanc classique utilisé au CIA</i>	45
III.B.2. <i>Spectres de rayonnement lumineux obtenus avec les tubes fluorescents blancs, bleus et rouges prévus pour l'exposition des animaux</i>	46
III.B.3. <i>Spectres de rayonnement lumineux obtenus avec les tubes fluorescents blancs et bleus équipés de filtres</i>	47
IV. DISCUSSION - PERSPECTIVES	49
IV.A. EXPERIENCE 1.....	49
IV.A.1. <i>Les traitements lumineux</i>	49
IV.A.2. <i>Les autres alternatives au lavage</i>	50
IV.B. EXPERIENCE 2.....	51
ANNEXE.....	52
BIBLIOGRAPHIE.....	53

TABLE DES FIGURES ET ILLUSTRATIONS

FIGURE 1 : STRUCTURE CELLULAIRE DE LA RETINE.....	10
FIGURE 2 : SPECTRE D'ABSORPTION DES PHOTORECEPTEURS (D'APRES BOWMAKER AND DARTNALL 1990)	11
FIGURE 3 : ILLUSTRATION DU MECANISME DE LA SAISONNALITE (TUAUDEN, 2014, CAFTI FORMATION DES INSEMINATEURS – REPRODUCTION CAPRINE)	12
FIGURE 4 : TROIS STRATEGIES POUR CONSERVER UNE QUALITE DE SEMENCE INTACTE	18
FIGURE 5 : REGULATION DE L'AHH PAR LES GONADES.....	19
FIGURE 6 : COMPARAISON DE L'ÉVOLUTION DE LA TESTOSTERONE PLASMATIQUE CHEZ DES BOUCS ALPINS SOUMIS A UNE PHOTOPERIODE NATURELLE OU A UN RYTHME 60JC/60JL (MODIFIEE, D'APRES DELGADILLO ET CHEMINEAU 1992)	20
FIGURE 7 : ÉVOLUTION DE PRODUCTION DE SEMENCE DE BOUCS A CAPGENES EN NOMBRE DE DOSES.....	22
FIGURE 8 : SCHEMA DU PROTOCOLE EXPERIMENTAL (EXEMPLE DE 10 BOUCS EN PHOTOPERIODE NATURELLE).....	24
FIGURE 9 : LAMPE FRONTALE EQUIPEE D'UN FILTRE ROUGE TRES OCCULTANT, DE FAÇON A NE LAISSER PASSER QU'UN FLUX FAIBLE ET INVISIBLE PAR LES BOUCS	27
FIGURE 10 : DEROULE D'UN JOUR D'ESSAI	28
FIGURE 11 : BATIMENT D'EXPERIMENTATION ET ETANCHEITE LUMINEUSE.....	29
FIGURE 12 : REPARTITION DES DONNEES DE TESTOSTERONEMIE EN FONCTION DU TRAITEMENT PHOTOPERIODIQUE	33
FIGURE 13 : REPARTITION DES DONNEES DE L'ACTIVITE DE LA LIPASE EN FONCTION DU TRAITEMENT PHOTOPERIODIQUE.....	34
FIGURE 14 : ÉVOLUTION TEMPORELLE CONJOINTE DU TTP ET DE L'ACTIVITE LIPASE SOUS ALTERNANCE 45JL/45JC.....	35
FIGURE 15 : ÉVOLUTION TEMPORELLE CONJOINTE DU TTP ET DE L'ACTIVITE LIPASE SOUS ALTERNANCE 60JL/60JC.....	35
FIGURE 16 : MATRICE DE CORRELATIONS ENTRE VARIABLES A ETUDIER.....	37
FIGURE 17 : MOBILITE A 5 MIN DE LA SEMENCE LAVEE ET NON LAVEE SELON LA PHOTOPERIODE	38
FIGURE 18 : MOBILITE A 60 MIN DE LA SEMENCE LAVEE ET NON LAVEE SELON LA PHOTOPERIODE	39
FIGURE 19 : MOBILITES DES SPERMATOZOÏDES SELON LA PHOTOPERIODE ET LE LAVAGE	39
FIGURE 20 : MOTILITE A 5 MIN DE LA SEMENCE LAVEE ET NON LAVEE SELON LA PHOTOPERIODE.....	40
FIGURE 21 : MOBILITE A 60 MIN DE LA SEMENCE LAVEE ET NON LAVEE SELON LA PHOTOPERIODE	41
FIGURE 22 : MOTILITES DES SPERMATOZOÏDES SELON LE LAVAGE ET LA PHOTOPERIODE	41
FIGURE 23 : NOMBRE DE SPERMATOZOÏDES DANS LA SEMENCE NON LAVEE SELON LA PHOTOPERIODE.....	42
FIGURE 24 : VOLUME ET CONCENTRATION DE LA SEMENCE SELON LA PHOTOPERIODE	43
FIGURE 25 : RENDEMENT DE CONGELATION SELON LA PHOTOPERIODE ET LE LAVAGE	44
FIGURE 26 : ECARTS RELATIFS DES RENDEMENTS DE CONGELATION EN FONCTION DU LAVAGE ET DE LA PHOTOPERIODE	44
FIGURE 27 : MESURE DU SPECTRE EMIS PAR UN TUBE FLUORESCENT (—) ET EVALUATION DU NOMBRE DE LUX EMIS (AIRE SOUS LA COURBE D'EMISSION LIMITEE AU CHAMP DE LA SENSIBILITE DE L'ŒIL HUMAIN (—)).....	45
FIGURE 30 : TABLEAU DES FILTRES UTILISES POUR LES DIFFERENTS TRAITEMENTS (C : COUCHE)	47

TABLE DES SIGLES

AGL : Acides gras libres
BUS : Sécrétions des glandes Bulbo-Urétrales
BUSgp60 : Glycoprotéine de 55-60 kDa des sécrétions des glandes bulbo-urétrales
CCD : Cycle Congélation – Décongélation
CIA : Centre d'Insémination Artificielle
CONC : Concentration
FSH : Hormone folliculostimulante
GRC : Groupe Reproduction Caprine
JC : Jours courts
JL : Jours longs
IA : Insémination Artificielle
KRPG : Krebs Ringer Phosphate Glucose (solution de lavage de la semence contenant du glucose)
LH : Hormone lutéinisante
MOB : Mobilité (faculté de déplacement)
MOT : Motilité (faculté de mouvement)
OS : Organisme de sélection
PA : Photopériode Artificielle
PLRP2 : Pancreatic lipase-related protein-2 (lipases pancréatiques apparentées de type 2)
PN : Photopériode Naturelle
PS : Plasma Séminal
RE : Rendement économique
RFRP-3 : RFamine-Related Peptide-3
THL : Tétra-Hydro-Lipstatine
TP : Traitements Photopériodiques
TTP : Taux de Testostérone Plasmatique
VOL : Volume

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Alimentation, santé, reproduction et bien-être de l'animal sont au cœur des préoccupations des éleveurs pour obtenir des niveaux de production satisfaisants et pérennes. Parmi les filières animales, l'élevage caprin en France métropolitaine représente 1 219 000 têtes, dont 839 000 chèvres qui ont produit 603 millions de litres de lait (Source : Agreste – Statistique Agricole annuelle). Le lait est principalement produit pendant les mois de mars à août au moment où les prix sont les plus faibles, ce qui incite les éleveurs à produire en contre-saison. Dans ce contexte, la reproduction est un enjeu de taille pour les éleveurs de cette filière.

Chez la chèvre, la reproduction est saisonnée et se déroule en jours courts, c'est-à-dire que les chèvres sont sexuellement au repos quand les jours sont longs et sont sexuellement actives quand les jours sont courts.

Les périodes d'activité sexuelle et leur durée varient selon la race et le pays. Comme le climat et les latitudes diffèrent en fonction des zones géographiques, les animaux soumis à de grandes variations de durée du jour au cours de l'année n'auront pas les mêmes cycles de reproduction que les animaux soumis à de très faibles variations. En effet, le principal facteur environnemental ayant un effet sur la saisonnalité de la reproduction réside dans les variations annuelles de la durée du jour.

Le contrôle photopériodique est régulé par la mélatonine, hormone sécrétée par la glande pinéale pendant les périodes d'obscurité. La mélatonine interagit ensuite avec les hormones du cycle sexuel. Ainsi à l'automne, lorsque les jours sont courts (et les nuits longues), la mélatonine est sécrétée plus longtemps et déclenche la cyclicité des espèces à reproduction de jours courts.

Les variations naturelles de la photopériode entraînent des variations sur la fonction de reproduction des mâles et des femelles. En effet, la fonction de reproduction est contrôlée par l'axe hypothalamo-hypophysaire via les hormones LH (Hormone lutéinisante) et FSH (Hormone folliculostimulante). Ces hormones stimulent l'activité des gonades, les testicules pour le mâle et les ovaires pour la femelle. Les sécrétions stéroïdiennes des gonades ont une activité inhibitrice ou stimulatrice sur l'axe hypothalamo-hypophysaire selon si l'animal est soumis aux Jours Longs (JL) ou aux Jours Courts (JC). Cette dualité d'activité entraîne des variations dans l'amplitude et la fréquence des pics de LH, qui vont déclencher ou empêcher l'ovulation chez la femelle. Cela correspond aux phases de période de repos et d'activité sexuelle, qui vont augmenter ou diminuer la sécrétion de la testostérone chez le mâle, qui aura pour conséquence des variations du volume testiculaire, de la production spermatique et du comportement sexuel du mâle.

Ces variations naturelles de la fonction de reproduction ne coïncident pas toujours avec les besoins des éleveurs. Le désaisonnement des animaux est un de leurs leviers d'action. Pour les espèces saisonnées, la maîtrise de la reproduction est donc un élément indispensable pour regrouper les mises bas par lot de femelles et/ou étaler la production de lait au long de l'année pour bénéficier d'un meilleur prix de vente pendant la période de contre-saison.

En France, les chèvres de race Alpine et Saanen ont une période d'activité sexuelle naturelle de novembre à février et une période de repos sexuel d'avril à septembre. Les Traitements Photopériodiques (TP) couplés à l'Insémination Artificielle (IA) permettent de désaisonner les chèvres et d'obtenir des femelles qui produisent du lait à contre-saison.

La période d'activité sexuelle peut être modifiée, en manipulant la durée d'éclairement à laquelle sont soumises les animaux. Elle consiste à mimer le cycle naturel annuel des variations de la durée du jour, sur une période plus courte. L'alternance artificielle de jours longs et de jours courts permet de stimuler l'activité sexuelle des animaux à différentes périodes de l'année et donc de produire en toutes saisons du lait pour ce qui est des chèvres et de la semence pour les boucs élevés en centre d'insémination artificielle (CIA). Cette manipulation de la durée du jour, appelée traitement lumineux ou traitement photopériodique, est la méthode de désaisonnement la plus répandue en élevage caprin.

Les protocoles actuels de désaisonnement rédigés par le Groupe Reproduction Caprine¹, s'ils sont bien appliqués, sont aujourd'hui efficaces en élevages. Ces protocoles permettent d'obtenir une seule période d'activité sexuelle d'un ou deux cycles (rarement trois) en avance ou en contre-saison mais n'enclenche pas une cyclicité d'une durée équivalente à une saison sexuelle naturelle. Pendant les phases d'éclairement, il est aujourd'hui recommandé que les animaux reçoivent un flux lumineux de 200 lux à la hauteur de leurs yeux. Cependant, bien que fonctionnelle, cette recommandation est purement empirique : les animaux sont sexuellement actifs avec ce niveau de flux lumineux, mais aucune étude scientifique n'a démontré quelle était l'intensité lumineuse minimale nécessaire pour déclencher cette activité. Les éleveurs souhaitent donc avoir des recommandations plus précises concernant les traitements lumineux à appliquer, notamment en ce qui concerne le flux lumineux optimal (couleur du spectre et intensité) et la possibilité d'utiliser des LED à la place des tubes fluorescents.

Par ailleurs, le désaisonnement est une conduite qui est souvent associée à la pratique de l'insémination artificielle (IA). Or, d'après les données de l'organisme de sélection caprine (OS) Capgènes², 73 600 chèvres ont été inséminées en 2016, soit un total de 8,8% du cheptel en production, comptant environ 788 000 chèvres. Ce pourcentage très faible est assez surprenant compte tenu des intérêts (génétique, sanitaire...) de l'IA, mais peut s'expliquer notamment par le coût élevé de l'insémination chez la chèvre (entre 22 et 30 € en moyenne – catalogue Evolution XY 2017).

Un quart du prix de l'insémination correspond au coût technologique du traitement de la semence. Une réduction de ce coût pourrait rendre l'IA accessible à plus d'éleveurs. Une des solutions pourrait être de réduire le coût technologique en supprimant l'étape de lavage de la semence. En effet, lorsque du sperme est directement congelé après la collecte et mis en paillette, les spermatozoïdes ne sont pas viables après la décongélation. Il a été montré que le contact prolongé entre le plasma séminal et les spermatozoïdes affecte grandement la motilité des spermatozoïdes après avoir subi un cycle de congélation/décongélation.

Afin de supprimer cette étape mais de conserver une bonne motilité/mobilité des spermatozoïdes, une solution alternative pourrait être l'utilisation des TP qui ont des conséquences directes sur la qualité de la semence. En effet, les variations photopériodiques régulent l'activité sexuelle des boucs, dont font partie le niveau plasmatique de testostérone et la qualité/quantité de semence. Il serait donc intéressant de déterminer s'il existe un rythme photopériodique pour lequel la composition du plasma séminal, qui dépend lui-même de la testostéronémie, n'a pas un effet délétère sur les spermatozoïdes.

Ainsi, deux grandes problématiques sont à traiter :

- Quel est / quels sont les rythmes photopériodiques permettant d'obtenir une production de semence régulière de bonne qualité après un cycle de congélation/décongélation ? Quels sont les effets du rythme photopériodique sur la qualité de semence lavée et non lavée ?
- Quelles sont les recommandations nécessaires et suffisantes concernant l'éclairage pour que les TP soient efficaces pour d'une part, désaisonner les chèvres et d'autre part, maintenir des boucs sexuellement actifs toute l'année ?

¹ Le GRC est un groupe de travail national animé par l'Idéle qui a pour mission d'animer la réflexion professionnelle, scientifique et technique autour de la problématique de la reproduction et d'apporter des réponses concrètes aux préoccupations de terrain. (Source : Institut de l'Élevage)

² Capgènes est à la fois l'unique organisme de sélection caprine en France et l'unique centre d'insémination artificielle (CIA) agréé à vocation commerciale.

I. ETAT DE L'ART

I.A. Photopériode et activité sexuelle chez les caprins

Les variations de la durée du jour sont captées au niveau de la rétine, par des cellules photosensibles et transmises par voie nerveuse jusqu'à la glande pinéale, qui sécrètera alors une quantité variable de mélatonine selon l'information lumineuse. La mélatonine agit ensuite sur les hormones du cycle sexuel, ce qui permet de contrôler la fonction de reproduction des caprins et de la rendre saisonnée.

La saisonnalité de la reproduction des caprins entraîne des contraintes naturelles de production pour l'éleveur. En effet, comme les mises bas se déroulent de janvier à mars, la production laitière s'étale du printemps à l'été. Or, à cette période, l'offre est plus haute que la demande, les prix sont donc bas. Entre la pression exercée par les industries de transformation laitière pour être approvisionnées toute l'année et la possibilité d'obtenir un meilleur prix, les éleveurs sont incités soit à étaler la production de lait tout au long de l'année, soit à ne produire qu'en contre-saison, là où les prix sont les plus élevés.

Pour produire du lait en contre-saison, il est nécessaire de désaisonner les chèvres afin d'avoir des mises bas en septembre et pouvoir fournir du lait en automne et en hiver. Le désaisonnement est le plus souvent permis par les traitements photopériodiques, qui consistent à alterner des jours longs et des jours courts, indépendamment de la photopériode naturelle. Le Groupe Reproduction Caprine propose des protocoles de désaisonnement consistant à alterner 90 jours longs (16 heures d'éclairage en continu) et 60 jours courts (8h d'éclairage en continu) pour les mâles et les femelles. Il est de plus essentiel de fournir un flux lumineux suffisant : il est recommandé de fournir au moins 200 lux à hauteur des yeux des animaux. Cette dernière règle est purement empirique : les animaux sont effectivement sexuellement actifs après application de ce protocole avec ce flux lumineux, mais aucune étude n'a démontré quelle était l'intensité lumineuse minimale nécessaire pour déclencher cette activité.

Les éleveurs, et la filière de manière générale, souhaiteraient donc :

- Des recommandations plus fines concernant l'intensité optimale du flux lumineux à fournir aux animaux,
- Une évaluation de l'efficacité des éclairages LED en remplacement des tubes fluorescents dont la fabrication sera définitivement stoppée en 2020
- Une caractérisation du type de lumière à utiliser, c'est-à-dire, quelle gamme du spectre lumineux est nécessaire et suffisante pour contrôler l'activité sexuelle des animaux.

Pour cela, un vaste projet de recherche a été récemment mis en place par 3 équipes INRA dont l'équipe Ferticap de l'UE FERLUS dans laquelle j'ai réalisé mon stage. Ce projet vise à mieux comprendre quels sont les paramètres (intensité et gamme du spectre) du traitement photopériodique qui influent sur le comportement sexuel caprin dans un premier temps et à comparer dans un second temps les effets biologiques sur le comportement sexuel des mâles et des femelles de TP réalisés comparativement entre LED et tubes fluorescents en accord avec les paramètres minimums définis dans l'étape une.

I.A.1. Transmission de la lumière : de sa perception aux cascades biochimiques

La lumière, et donc *a fortiori*, les changements de photopériode sont perçus au niveau des yeux des animaux. Ils reçoivent deux types d'informations. La première est l'information visuelle : les rayons lumineux convergent au niveau de la rétine et sont interprétés par le cerveau. Il est alors possible d'avoir une image de ce qui est observé. La seconde est l'information qualifiée de « non visuelle » : elle permet la détection de l'intensité lumineuse par la mélanopsine, protéine photosensible située dans l'œil. Ce mécanisme intervient notamment dans la régulation des rythmes circadiens¹.

Le bulbe de l'œil se divise en différentes parties. Celle qui nous intéresse ici est la rétine : c'est là que convergent les rayons lumineux. Elle est à la fois un tissu nerveux et une mince membrane pluristratifiée sensible à la lumière. Trois couches de neurones s'y succèdent : les neurones ganglionnaires, les neurones bipolaires et les photorécepteurs.

Chaque couche a son propre rôle dans la transmission des informations lumineuses. Les photorécepteurs sont les premiers à réagir à la lumière : ce sont des récepteurs sensoriels. Lorsqu'ils sont stimulés, c'est-à-dire, lorsqu'ils reçoivent un photon de lumière, les pigments visuels des photorécepteurs subissent un changement de conformation, ce qui engendre une hyperpolarisation rapide de la membrane de l'axone des neurones. Celle-ci est qualifiée de potentiel d'action et se transmet aux autres couches de neurones via les synapses. Les neurones bipolaires sont les seconds à entrer en action et, via leur double axone, permettent la liaison entre photorécepteurs et cellules ganglionnaires. Ces dernières constituent la dernière couche de la rétine recevant l'information lumineuse. Les axones de ces cellules fusionnent pour former le nerf optique. Les nerfs optiques de chacun des yeux se rejoignent au niveau du chiasma optique et l'information lumineuse est transmise le long des fibres nerveuses jusqu'au cerveau où elle sera interprétée (figure 1).

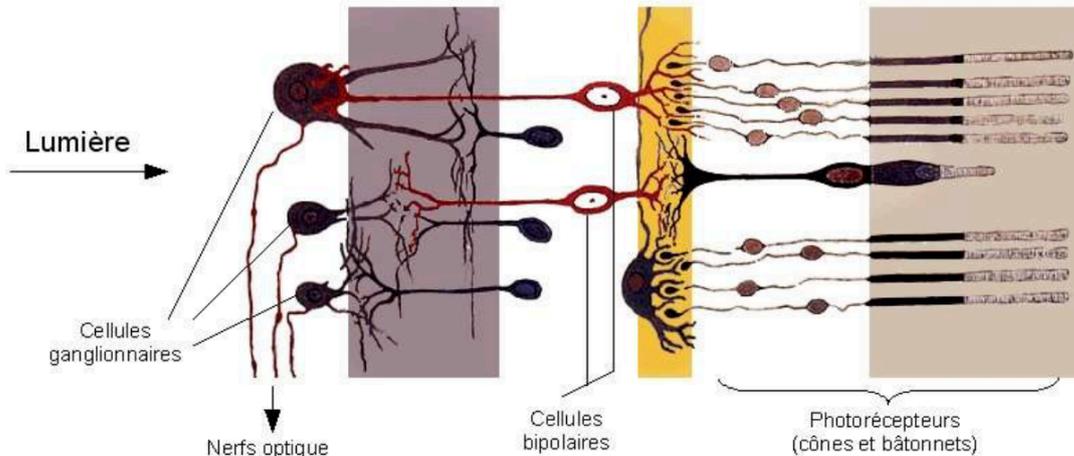


Figure 1 : Structure cellulaire de la rétine.

Source : S.R.Y. CAJAL, Histologie Du Système Nerveux de l'Homme et Des Vertébrés, Maloine, Paris, Wikimedia Commons

Comme légendé sur la figure 1, il existe deux types de photorécepteurs visuels avec deux fonctions bien différentes : les bâtonnets et les cônes. Ce sont des photorécepteurs ciliaires, c'est-à-dire qu'ils disposent d'un cil fonctionnel où se trouvent les photopigments.

¹ Un rythme circadien est un rythme biologique d'une durée de 24 heures environ qui possède au moins un cycle par période de 24 heures.

Les bâtonnets sont les plus nombreux. Ils sont sensibles aux très faibles éclaircissements et permettent ainsi la vision nocturne (ou vision scotopique) mais ne permettent pas la visualisation des couleurs et des détails. Au contraire, les cônes sont moins sensibles à la lumière et nécessitent un plus grand flux lumineux pour être activés. Ils permettent la vision des détails et des couleurs. Ces deux types de photorécepteurs sont complémentaires.

Les photorécepteurs à l'origine de la vision possèdent des pigments visuels dits photosensibles (figure 2). Ce sont la rhodopsine pour les bâtonnets et les différentes opsines pour les cônes. Il existe trois types d'opsine en fonction de leur spectre d'absorption :

- Opsine B (ou S) : absorption maximale dans le bleu à 420nm
- Opsine V (ou M) : absorption maximale dans le vert à 530nm
- Opsine R (ou L) : absorption maximale dans le rouge à 560nm

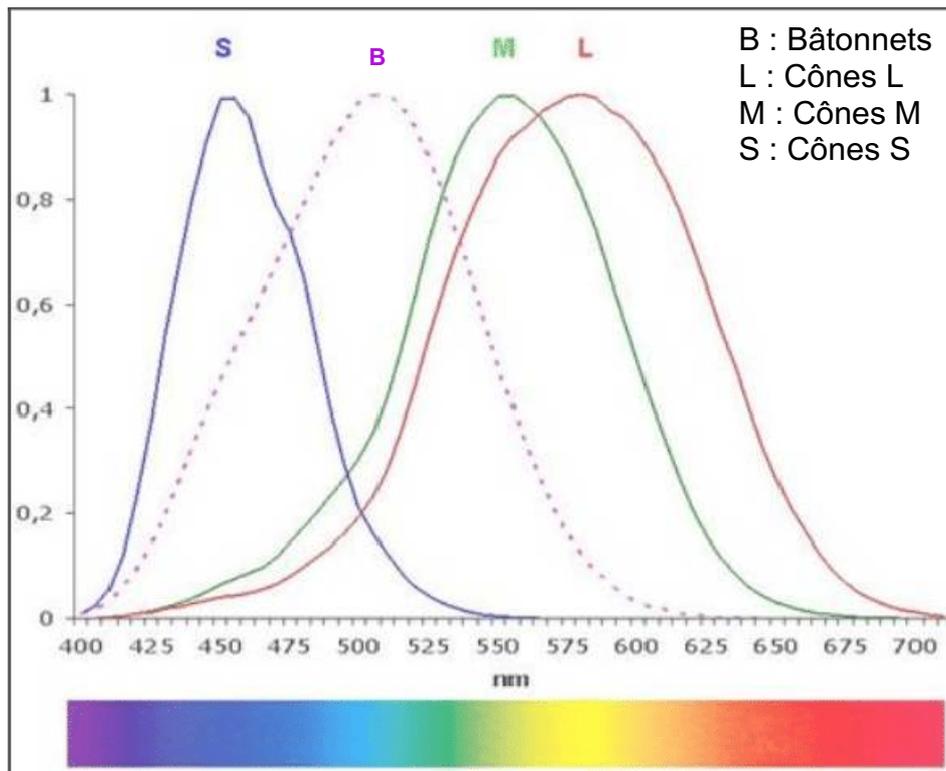


Figure 2 : Spectre d'absorption des photorécepteurs (d'après Bowmaker and Dartnall 1990)

Ainsi, les pigments ont des spectres d'absorption différents, ce qui permet d'avoir une vision polychromatique pour les animaux qui les possèdent. Ces pigments sont des associations de deux molécules : une protéine (rhodopsine/opsine) et un aldéhyde polyinsaturé, le rétinale. Il s'agit d'une des trois formes de la vitamine A. Lorsqu'il y a stimulation lumineuse des photorécepteurs, c'est le rétinale qui change de conformation. Il subit une photoisomérisation lorsqu'il absorbe un photon, passant du *11-cis-retinal* au *tout-trans-retinal*. C'est grâce à cette transformation conformationnelle que l'énergie lumineuse peut être convertie en impulsions nerveuses et générer un potentiel d'action.

Ces deux photorécepteurs sont connus depuis 150 ans. Cependant, un troisième photorécepteur a récemment été découvert par la communauté scientifique. Il s'agit de la mélanopsine. Elle est présente dans les cellules ganglionnaires, et plus précisément dans leurs dendrites, leur axone proximal et leurs membranes cellulaires, d'où sa qualification de photorécepteur rhabdomérique : ses photopigments sont disposés au niveau d'un ensemble

de microvillosités membranaires. Grâce aux axones des cellules ganglionnaires, qui sont reliés aux noyaux suprachiasmiques, l'information est directement transmise au cerveau. Deux différences de fonctionnement ont été découvertes entre photorécepteurs visuels (cônes et bâtonnets) et photorécepteurs non visuels (mélanopsine dans les cellules ganglionnaires). D'une part, lorsque les cellules ganglionnaires absorbent des photons lumineux, leur réponse est très lente par rapport à celle des photorécepteurs visuels, ce qui permet d'acquérir un plus grand nombre d'informations sur l'intensité lumineuse environnante.

La mélanopsine ne contribue pas à la vision, elle permet la détection de l'intensité lumineuse. Il est ainsi possible pour l'animal de déterminer les périodes de luminosité et d'obscurité ainsi que les changements de photopériode, c'est-à-dire les passages des jours croissants aux jours décroissants et inversement. Cette perception de l'intensité lumineuse permet d'envoyer un message nerveux à la glande pinéale afin que celle-ci sécrète une neurohormone, la mélatonine (N-acétyl-5-méthoxytryptamine) pendant les phases d'obscurité.

I.A.2. Effets des signaux lumineux sur le cycle reproducteur

La différence de sécrétion de mélatonine entre jours courts et jours longs conditionne la saisonnalité de la reproduction.

Lors des périodes de jours courts, la sécrétion plus importante de mélatonine active la synthèse de deux neuropeptides : le kisspeptine, puissant activateur des neurones à GnRH et le RFRP-3 (RFamine-Related Peptide-3), inhibiteur de l'axe gonado-hypothalamo-hypophysaire et donc inhibiteur des neurones à GnRH. Les neurones à GnRH régulent la libération des hormones hypophysaires LH et FSH, qui contrôlent la croissance et l'activité des gonades (CNRS - Institut des neurosciences cellulaires et intégratives).

Les gonades, ovaires et testicules, produisent des stéroïdes, œstrogène et testostérone, en quantité variable selon le message transmis par les neurones à GnRH. Ces stéroïdes exercent un rétrocontrôle sur l'axe hypothalamo-hypophysaire (AHH). Les différences de sensibilité de l'AHH au rétrocontrôle négatif des stéroïdes entraînent des variations des niveaux de sécrétion des hormones gonadotropes la LH et la FSH en fonction des jours courts et des jours longs.

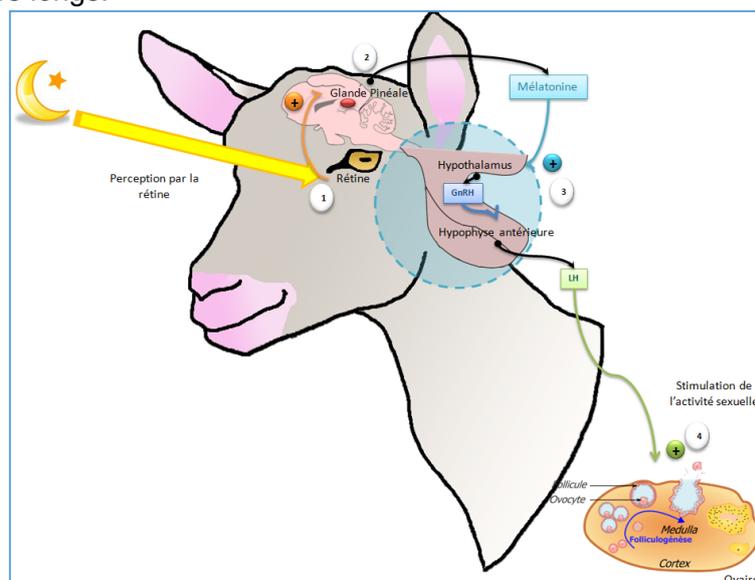


Figure 3 : Illustration du mécanisme de la saisonnalité (Tuauden, 2014, CAFTI Formation des inséminateurs – Reproduction Caprine)

Cependant, il ne suffit pas d'avoir des jours croissants ou des jours décroissants, il est nécessaire que les animaux soient soumis aux jours longs et aux jours courts puisque c'est le changement de photopériode qui induit le déclenchement de la période d'activité sexuelle.

I.A.3. Traitements photopériodiques de préparation à la reproduction : problématiques actuelles de la mise en œuvre en élevage

Une des missions du GRC est la rédaction de fiches techniques sur le thème de la reproduction à destination des éleveurs et des techniciens caprins. Parmi ces fiches, deux fiches traitent des traitements photopériodiques : « Les traitements photopériodiques et la reproduction caprine » et « Installations photopériodiques pour la reproduction des caprins ». Ces fiches indiquent comment utiliser les TP en élevage et leurs conséquences.

Lorsque les recommandations en matière de TP sont bien respectées, ils permettent, en dehors de la saison sexuelle, de déclencher au moins un cycle ovulatoire et des chaleurs chez les chèvres et la mise en place du comportement sexuel et la production de semence de qualité chez les mâles.

Si les recommandations ne sont pas bien appliquées, des effets négatifs apparaissent. Les deux exemples les plus probants sont 1) l'apparition d'un état réfractaire chez les animaux soumis trop longtemps à des jours courts ou à des jours longs, leur régulation hormonale est alors perturbée et ils peuvent présenter une activité complètement déphasée ; 2) l'exposition à un nombre de jours courts et de jours longs insuffisants empêche que la totalité du troupeau atteigne le stade physiologique nécessaire pour obtenir une stimulation de suffisante de l'activité sexuelle.

Les recommandations actuelles faites dans ces fiches sont :

- Alternier les jours longs et les jours courts
- Soumettre les animaux à 90 JL consécutifs
- Soumettre les animaux à 60 JC consécutifs
- Avoir 200 lux à hauteur des yeux des animaux

Or, ces recommandations sont insuffisantes pour les éleveurs. En effet, bien que l'utilisation de la photopériode artificielle ait des effets connus sur la production laitière, la maîtrise de la saisonnalité de la reproduction et le comportement, il n'existe aujourd'hui aucune norme réglementaire sur l'éclairage en bâtiments d'élevage, en dehors de l'interdiction de soumettre les animaux à un éclairage continu ou une obscurité continue (normes minimales relatives à la protection des animaux dans les élevages (directive communautaire 98/58/CE) : « *Les animaux gardés dans des bâtiments ne doivent pas être maintenus en permanence dans l'obscurité ni être exposés sans interruption appropriée à la lumière artificielle. Lorsque la lumière naturelle est insuffisante pour répondre aux besoins physiologiques et éthologiques des animaux, un éclairage artificiel approprié doit être prévu* »).

Actuellement, il n'existe qu'une recommandation sur l'intensité à apporter aux animaux lors des TP. Or, sur la base de recherches menées sur l'homme et d'autres espèces animales (Wright 2001, Kayumoy, 2005), l'intensité ne serait pas le seul paramètre à prendre en compte. En effet, c'est une gamme de longueurs d'ondes spécifique qui a un effet sur la sécrétion de mélatonine et les rythmes circadiens (Robert 2014, Glickman 2012). Il est donc important de caractériser la part utile du spectre lumineux pour les traitements photopériodiques utilisés en élevage, de façon à améliorer les recommandations d'éclairage (gamme du spectre x intensité minimale) et éventuellement réduire les coûts. De plus, la mise en œuvre des traitements photopériodiques en élevage peut parfois s'avérer contraignante en raison des incompatibilités horaires entre éclairage nécessaire au travail de

l'éleveur et éclairage lié au traitement. La définition d'un spectre adapté pourrait limiter ces interférences et favoriser la généralisation de cette pratique.

L'offre actuelle en termes de types de sources lumineuses est bien plus large que les seules lampes tubulaires fluorescentes (souvent appelées par abus de langage « néons ») recommandées par exemple dans les ateliers de transformation (Blanchin, 2014, L'éclairage des bâtiments d'élevage de ruminants). Les incitations à passer aux LED, qu'elles soient commerciales ou publiques (encadrées par la loi de transition énergétique), sont nombreuses avec des arguments de coûts et de consommation énergétique. Certains équipements LED s'affichent comme spécialisés pour l'élevage. Or, il n'y a aujourd'hui pas d'information technique ni scientifique sur l'efficacité de ce type de sources lumineuses dans le cadre de traitements photopériodiques pour la maîtrise de la reproduction des ruminants, ni sur leur éventuel impact sur d'autres fonctions (la production laitière, le bien-être et le comportement etc ...). Dans le cadre du projet CASDAR Maxi'Mâle, l'ensemble des CIA ovins et caprins français ont été enquêtés, entre autres, sur leur pratique du photopériodisme. L'un d'entre eux venait, en 2015, de rééquiper tout un bâtiment avec des LED et constatait que ses béliers n'étaient pas aussi actifs qu'avant. Il a depuis revu son installation lumineuse, ce qui laisse à penser que des recommandations spécifiques aux LED sont nécessaires.

Par ailleurs, les tubes fluorescents ne bénéficient plus d'une très bonne image en raison de leur faible longévité et de leur consommation électrique peu économe relativement au LED, et l'arrêt de leur production par les fabricants étant déjà programmé (en lien avec la réglementation européenne 245/2009 sur l'écoconception), il apparaît urgent de déterminer quelle source lumineuse alternative serait la plus proche en termes d'efficacité dans le cadre de traitements photopériodiques de reproduction.

Ces questions de la filière caprine autour des TP, adressées à l'équipe FERTICAP de l'INRA UE FERLUS, spécialisée en reproduction caprine, s'ajoutent aux réflexions internes menées sur l'optimisation des équipements lumineux de leur nouveau bâtiment pour le CIA, en termes de consommation d'énergie et d'efficacité pour la préparation des animaux à la reproduction.

I.B. Insémination et Production de semence en centre d'insémination artificielle caprin

La photopériode a un effet sur la régulation de l'activité sexuelle. En effet, l'alternance entre période d'activité sexuelle et période de repos sexuel est contrôlée par les variations de l'activité gonadotrope : faible pendant le printemps et l'été, forte en automne et en hiver. Elle exerce un contrôle indirect sur le comportement sexuel et la production de sperme puisque les variations de la fréquence et de l'amplitude des pics de LH induit une plus ou moins forte concentration en testostérone, hormone régulatrice du comportement sexuel (P. Chemineau, JA. Delgadillo, *Neuroendocrinologie de la reproduction chez les caprins*).

Il a été montré, d'une part, que la concentration en testostérone était dépendante de la photopériode et d'autre part, que ces variations saisonnières pouvaient être altérées avec des traitements photopériodiques (Delgadillo, 1990). L'affaiblissement de ces variations permet de conserver un niveau de testostérone moyen mais suffisant pour préserver l'activité sexuelle. L'utilisation de traitements photopériodiques peut donc permettre une augmentation de la quantité et de la qualité de la production de semence par le nivellement des variations de la testostéronémie et le maintien de l'activité sexuelle au cours de l'année. Cependant, produire de la semence ne suffit pas, il faut pouvoir la conserver. Or, la semence de boucs présente des problèmes de motilité et donc de fertilité après avoir subi un cycle de congélation et décongélation. Des études préliminaires ont montré que la présence de plasma séminal a un effet délétère sur la qualité des spermatozoïdes après un cycle de

congélation-décongélation et que c'est une glycoprotéine issue des sécrétions des glandes bulbo-urétrales qui en est responsable.

Pour contrecarrer cet effet, une technique de lavage de la semence a été mise au point. Or, cette étape entraîne la perte de 15% des spermatozoïdes et est coûteuse, elle contribue à 25% du prix de l'IA. La recherche d'une méthode alternative au lavage permettrait d'une part de baisser le prix de l'IA et donc de pouvoir rendre accessible l'IA à un plus grand nombre d'éleveurs, et d'autre part, conserver les molécules bénéfiques aux spermatozoïdes contenues dans le plasma séminal.

La composition du plasma séminal dépend de la testostéronémie. Comme la photopériode régule la concentration en testostérone, il devrait être possible avec des traitements photopériodiques adaptés, de trouver une composition en plasma séminal dont la concentration de la glycoprotéine serait suffisamment faible pour éviter d'avoir un effet néfaste sur les spermatozoïdes. Si tel est le cas, il serait possible d'éviter la phase de lavage de la semence. Deux problématiques se posent :

- Quel est / quels sont les rythmes photopériodiques permettant d'obtenir une semence de bonne qualité après un cycle de congélation/décongélation ?
- Quels sont les effets du rythme photopériodique sur la qualité de semence lavée et non lavée ?

I.B.1. Utilisation de la semence de boucs en IA : avantages et inconvénients

L'insémination artificielle présente des avantages sanitaires, génétiques et économiques pour les élevages caprins. En effet, l'IA permet de :

- Améliorer la valeur génétique de son troupeau sans avoir à acquérir des mâles à prix élevés. Les jeunes femelles issues d'IA seront soit conservées pour le renouvellement du troupeau soit vendues à d'autres éleveurs
- Contrôler la paternité et donc la filiation de chaque jeune
- Eviter de conserver trop de mâles sur l'exploitation, ce qui facilite la conduite d'élevage
- Assurer une reproduction à contre saison avec des paillettes de semence congelée lorsque la saillie naturelle est impossible
- Dissocier dans le temps et dans l'espace la collecte de la semence et l'insémination.
- Empêcher la transmission de maladies et d'infections sexuellement transmissibles en évitant tout contact entre appareils génitaux

Cependant, les avantages de l'IA sont contrebalancés par ses inconvénients :

- Le coût de l'IA est relativement élevé et est un frein pour les éleveurs
- Il est recommandé que les femelles ne reçoivent pas plus de 3 traitements hormonaux pour synchroniser les chaleurs dans leur carrière. En pratique, les éleveurs poursuivent autant que possible ces traitements sur les femelles à haute production
- Les contraintes du protocole de synchronisation des chaleurs (multiples interventions sur les animaux nécessitant un tri et une contention individuelle : pose d'éponge vaginale, injections, retrait d'éponge...) et l'utilisation d'hormones peuvent être des freins pour les éleveurs
- Les niveaux de fertilité après une IA en semence congelée ne sont que de 59,6% (Bilan national Capgènes 2017), ce qui reste faible compte tenu de l'investissement initial

De plus, on peut penser que l'utilisation d'un nombre limité de boucs pourrait conduire à un accroissement de la consanguinité et donc à une baisse de la variabilité génétique. Or, cela est très peu probable grâce à la vigilance du schéma de sélection global (suivi annuel du pourcentage de consanguinité du cheptel intégré dans le schéma) et à la mise en place d'un programme de gestion des accouplements qui permet de signaler toute incompatibilité génétique entre mâle et femelle. Quant à la diffusion de tares héréditaires ou de maladies en semence congelée provenant de CIA, cela semble très difficile compte tenu des précautions prises : pointage des animaux, grand nombre de sérologies, mise en quarantaine des boucs à leur arrivée, bâtiments isolés...

Le développement de l'usage de l'IA doit passer par une amélioration de la production de semence, en qualité et en quantité. À l'heure actuelle, pour augmenter les chances de réussite d'une IA, une bonne préparation des mâles et des femelles est indispensable. Si cette préparation n'est pas faite correctement, les résultats de fertilité, déjà relativement faibles, seront encore plus médiocres.

Pour les mâles, cette préparation repose en premier lieu sur une habitude à la collecte dans un vagin artificiel, nécessaire pour pouvoir collecter le mâle régulièrement sans difficulté. Le processus d'habitude conduit au CIA de Capgènes dure plusieurs semaines et commence, pour chaque nouvelle série de boucs, au mois de septembre suivant l'entrée à Capgènes, soit entre 6,03 et 12,60 mois d'âge selon la saison de naissance des boucs (données Capgènes : âge à la première sollicitation sur la période 1994-2012 évalué sur 2170 boucs Alpains et Saanen, moyenne = 9,10 mois). Seuls les boucs dont la semence répond aux critères de motilité et de mobilité après le cycle de congélation/décongélation (CCD) et dont la fertilité est considérée comme bonne sont conservés au CIA pour produire environ 3000 doses chacun. Ces différences de résistance de la semence des boucs au CCD restent difficiles à expliquer finement car elles sont certainement d'origine multifactorielle.

Pour autant, il existe un facteur connu d'altération de la semence des boucs : le contact prolongé entre les spermatozoïdes et le plasma séminal lors de la conservation avant insémination induit une baisse de motilité. Le plasma séminal est composé des sécrétions de l'épididyme, des vésicules séminales, de la prostate et de glandes bulbo-urétrales (BUS) ou glandes de Cowper.

Afin de déterminer quelles sécrétions ont un effet néfaste sur les spermatozoïdes, une étude a été menée sur des spermatozoïdes prélevés au niveau de la queue de l'épididyme, c'est-à-dire, non mélangés au plasma séminal. Les spermatozoïdes ont été mis en contact avec différents types de sécrétion des glandes annexes avant et après un CCD. Les résultats montrent que ce sont les sécrétions des glandes bulbo-urétrales (BUS) qui sont responsables de la détérioration de la qualité des spermatozoïdes en semence congelée, en provoquant une diminution de la motilité et une détérioration de l'intégrité de l'acrosome (Corteel, 1980, Nunes et al., 1982). Parallèlement, il a été montré qu'une fraction des sécrétions des vésicules séminales pouvaient avoir un effet bénéfique sur la qualité de la semence conservée (Nunes et al., 1982).

I.B.2. Identification de la glycoprotéine responsable de la dégradation de la qualité de la semence

Pellicer-Rubio *et al.* (1997) ont purifié et caractérisé l'enzyme produite par les BUS et responsable de la dégradation de la qualité de semence. Il s'agit d'une glycoprotéine monomère de 55-66 kDa à activité lipase, nommée BUSgp60. Sa structure ressemble à celle des lipases pancréatiques apparentées de type 2, nommées PLRP2 (Sias 2000). En plus de son activité de lipase classique (hydrolyse sélective de triglycérides), il semblerait qu'elle ait une activité phospholipase (Thirstrup *et al.*, 1994) : elle hydrolyse spécifiquement les phospholipides, principaux composants de la membrane plasmique des spermatozoïdes.

En France, les paillettes de semence caprine congelée sont fournies exclusivement par Capgènes. Même si certaines entreprises ont mis au point des milieux cryo-préservants (ex : OVIXCell d'IMV Technologies), les paillettes d'IA de Capgènes sont conditionnées dans un milieu fabriqué sur place à base de lait écrémé, de glucose et de glycérol (manuel FAO, Baril, *et al.*, 1993). Celui-ci est peu cher, facilement disponible en grande quantité et son rôle protecteur lors des étapes de refroidissement et de congélation a été démontré (Memon *et al.*, 1985). Cependant, il a été montré qu'il existait un effet délétère uniquement lorsque la semence est mélangée à un dilueur contenant des protéines de lait et des triglycérides résiduels ou mélangée à des protéines purifiées et des triglycérides (M-T. Pellicer-Rubio, Y. Combarrous (1998).

Ainsi, lorsque de la semence est diluée dans du lait écrémé et incubée à 37°C, l'activité lipase de BUSgp60 a pour conséquence :

- Une diminution du pourcentage de spermatozoïdes motiles
- Une détérioration de la qualité de mouvement de la semence
- Une destruction de l'acrosome
- Une mort cellulaire des spermatozoïdes épидидymaires

I.B.3. Lavage de la semence : étape actuellement cruciale pour une bonne qualité de semence après congélation

Afin de pallier le problème de détérioration de la qualité de la semence, une méthode de lavage de la semence a été mise au point. Elle consiste à faire une double centrifugation dans une solution Krebs Ringer Phosphate contenant du glucose (K RPG) dès la collecte. La semence ainsi lavée peut alors être diluée dans son milieu de conservation à base de lait sans qu'il y ait une détérioration de la qualité.

Bien qu'étant une étape chronophage qui augmente le prix de la dose d'IA et qui entraîne une perte de 15% de spermatozoïdes, l'extraction quasi-complète du plasma séminal par cette méthode augmente les chances de survie des spermatozoïdes après les étapes de congélation/décongélation. À l'heure actuelle, il s'agit de la seule méthode permettant d'atteindre des niveaux de fertilité acceptables en semence congelée. Néanmoins lorsque la semence est lavée, les éventuels effets bénéfiques du plasma séminal pour la survie des spermatozoïdes dans le tractus après insémination sont évidemment inexistantes.

Afin de conserver ces effets bénéfiques et supprimer le coût de la charge technologique du lavage, d'autres méthodes de traitement de la semence avant mise en paillette ont été explorées : utiliser un inhibiteur de l'activité lipase ou utiliser des molécules qui « captent » les acides gras libres résultant de la dégradation des triglycérides.

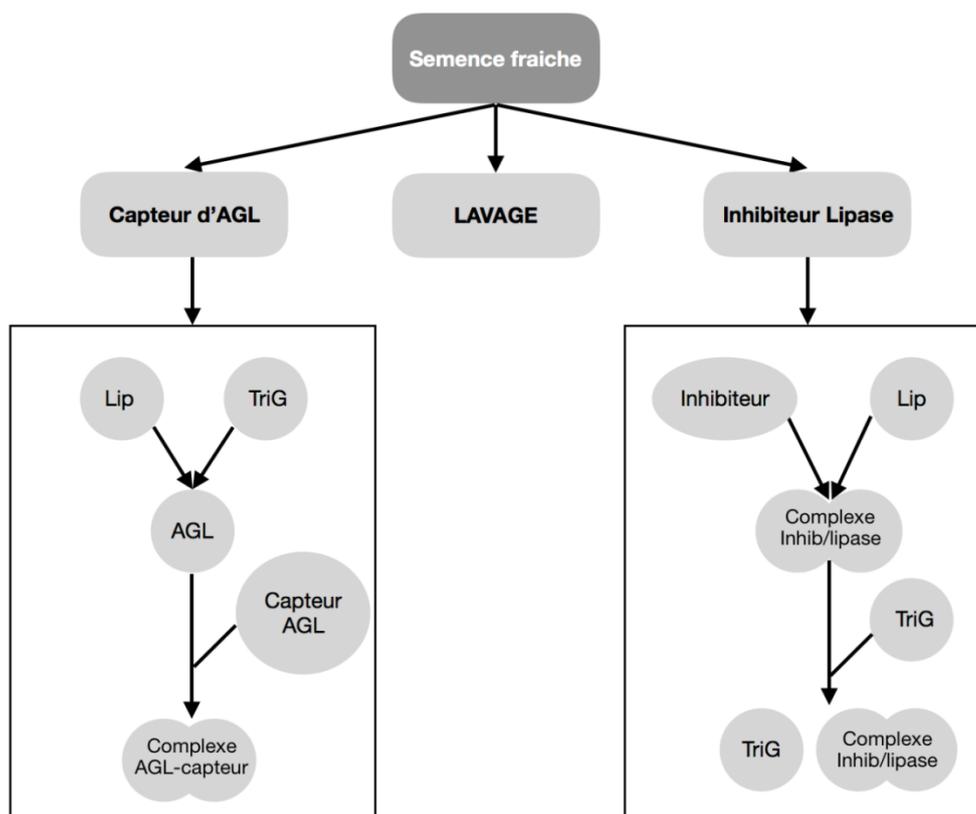


Figure 4 : Trois stratégies pour conserver une qualité de semence intacte

(Légende : Lip : Lipase, TriG : Triglycérides, AGL : Acides gras libres)

I.B.4. Méthodes alternatives proposées au lavage de la semence

L'accumulation dans le milieu de conservation d'acides gras libres lors de l'hydrolyse des triglycérides du lait, en particulier l'acide oléique (Pellicer-Rubio et al. 1997), est toxique pour les spermatozoïdes. Ceux-ci s'intercalent dans la membrane plasmique, ce qui fragilise la membrane de l'acrosome et entraîne une capacitation précoce dont les conséquences sont un mauvais taux de survie des spermatozoïdes après le CCD.

Il a donc été proposé d'utiliser :

- Soit un capteur d'AGL : la β -cyclodextrine,
- Soit un inhibiteur de la lipase pancréatique : la tétra-hydro-lipstatine (THL).

La β -cyclodextrine agit en aval de l'hydrolyse des triglycérides, elle forme un complexe avec les produits d'hydrolyse, ce qui inhibe leurs effets néfastes. Cependant, les spermatozoïdes ayant subi un CCD ne survivent pas malgré l'ajout de la β -cyclodextrine. Ceci pourrait s'expliquer par l'initiation précoce de la capacitation des spermatozoïdes. En enlevant le cholestérol membranaire et en phosphorylant des résidus tyrosine, la β -cyclodextrine déstabilise la membrane plasmique, ce qui facilite la réaction acrosomique et s'avère défavorable à la survie à un CCD.

La THL empêche la lipolyse en se fixant sur le site catalytique de la lipase à la place des triglycérides. Cependant, lorsque de la THL est ajoutée à de la semence non lavée (donc en présence de lipase) et que mobilité, motilité, rendement de congélation sont comparés, les résultats avec THL restent moins bons que ceux de la semence lavée mais également moins bons que ceux de la semence non lavée alors qu'on s'attendrait à ce qu'ils soient améliorés. La THL n'est donc pas la solution à utiliser. Ce résultat suggère que malgré l'inhibition de

l'activité lipase, la qualité de la semence est tout de même altérée. Il doit donc y avoir un autre facteur, indépendant de l'activité lipase (donc non inhibé par la THL) qui a un effet délétère sur la semence. La glycoprotéine BUSgp60 possède également une activité phospholipase A. Il n'est pas exclu qu'elle agisse directement sur les phospholipides membranaires des spermatozoïdes et soit responsable de l'effet néfaste sur la semence. Cependant, pour le moment, aucune étude n'a été conduite dans ce sens.

I.B.5. Effets de différents rythmes photopériodiques artificiels sur la production de semence

Les différences de sensibilité de l'AHH au rétrocontrôle négatif des stéroïdes entraînent des variations des niveaux de sécrétion des hormones gonadotropes que sont la LH (Hormone lutéinisante) qui induit la stéroïdogénèse et la FSH (Hormone folliculostimulante) qui induit la gamétogénèse, en fonction des jours courts et longs, ce qui conditionne les variations du niveau de testostérone plasmatique chez le mâle et donc la saisonnalité de leur activité sexuelle.

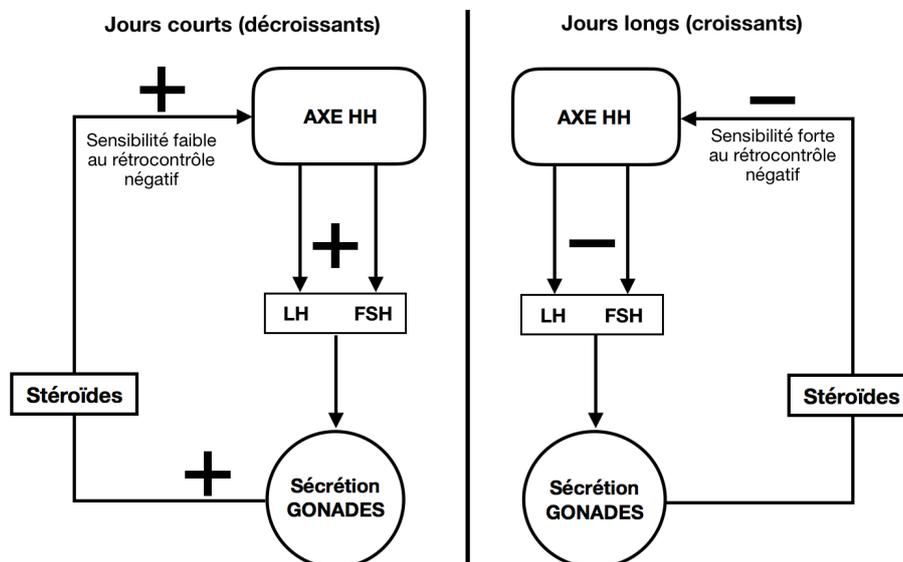


Figure 5 : Régulation de l'AHH par les gonades

Cependant, comme le photopériodisme diffère entre cycle naturel de JC/JL et alternance artificielle de JC/JL, la testostérone plasmatique présente des variations d'amplitude et de phase différentes. Pour comparaison, des boucs soumis à une alternance de 60JL/60JC atteignent trois pics de testostérone au cours d'une année tandis que les boucs soumis à une photopériode naturelle n'en atteignent qu'un seul sur une période identique (figure 6). La fréquence des pics est donc plus élevée sous conditionnement lumineux. A contrario, les valeurs maximales des pics de testostérone sont plus faibles pour les boucs sous alternance 60JL/60JC, ils atteignent 15 ng/ml en moyenne alors que les boucs sous photopériode naturelle atteignent des pics de 20-25 ng/ml, ce qui représente un écart de 25 à 40%.

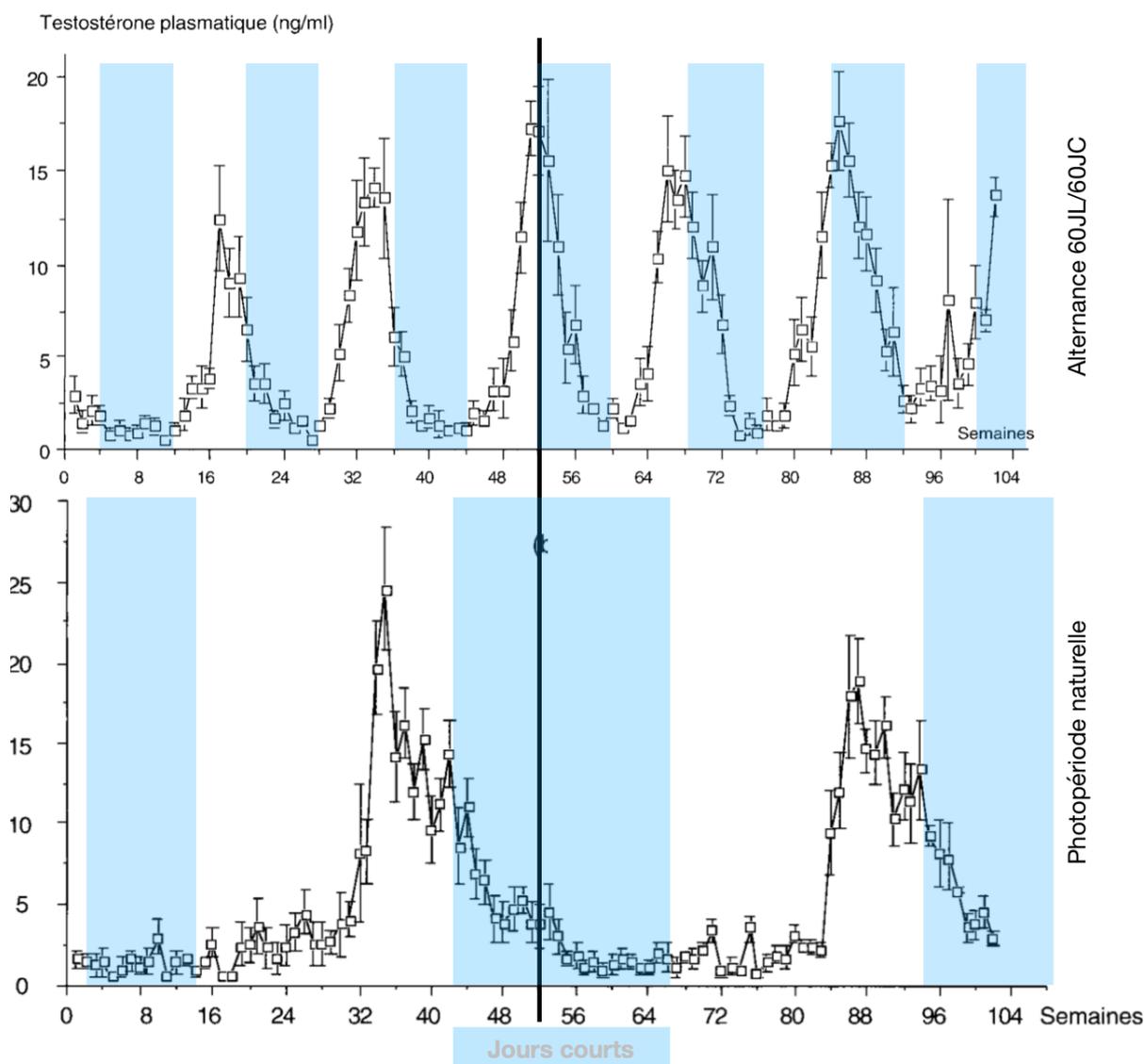


Figure 6 : Comparaison de l'évolution de la testostérone plasmatique chez des boucs Alps soumis à une photopériode naturelle ou à un rythme 60JC/60JL (modifiée, d'après Delgadillo et Chemineau 1992)

Ainsi, les variations de testostérone chez les boucs soumis à un conditionnement lumineux sont plus rapides mais plus atténuées que celles des boucs sous photopériode naturelle. Par ailleurs, des boucs soumis à un conditionnement lumineux 30JL/30JC présentent un profil différent : les pics de testostérone ne suivent pas de cycle, ils sont irréguliers et leurs valeurs sont comprises entre 5 et 10ng/ml. Il semblerait que ce conditionnement lumineux ne permette pas de conserver une stabilité du cycle de la sécrétion de testostérone. Ceci aurait alors pour conséquence d'avoir une réponse anarchique des boucs aux TP sur le long terme.

L'activité des glandes annexes, à savoir la quantité de sécrétions séminales qu'elles produisent, varie dans le même sens que le niveau de testostérone plasmatique. En effet, en période d'activité sexuelle, quand la testostéronémie est élevée, l'activité des glandes annexes l'est aussi, et les éjaculats produits ont un volume important avec une concentration en spermatozoïdes plus faible qu'en période de repos sexuel. La composition du plasma séminal dépend du niveau de sécrétions de chaque glande annexe. Les glandes bulbo-

urétrales produisent la glycoprotéine BUSgp60, responsable de l'effet délétère sur la semence de boucs après un CCD.

Est-il possible de réduire la testostéronémie à un niveau suffisamment bas pour que l'activité lipase soit réduite mais restant à un niveau suffisamment haut pour conserver un comportement sexuel constant des boucs au cours de l'année grâce aux traitements photopériodiques ?

II. MATÉRIELS ET MÉTHODES

II. A. Expérience 1 : Etude de différents traitements lumineux sur la semence caprine

II.A.1. Contexte du protocole

Les boucs exposés à la lumière naturelle ne peuvent produire de la semence que quelques mois dans l'année lors de la saison sexuelle, tandis que les boucs de CIA, soumis à des alternances rapides de jours longs et de jours courts, qui leur permettent de conserver une phase d'activité sexuelle constante, peuvent produire de la semence toute l'année. Ces différences de production s'expliquent par des différences de niveau de testostérone plasmatique. Les boucs en photopériode naturelle ont un seul pic de testostérone dans l'année, celui-ci correspond à l'unique période d'activité sexuelle. Le reste de l'année, la testostérone plasmatique est très basse ce qui supprime tout comportement sexuel. Au contraire, les boucs de CIA présentent plusieurs pics rapprochés de testostérone au cours de l'année, d'intensité moins élevée, mais la combinaison « fréquence-intensité » est optimale pour maintenir un niveau de testostérone suffisant afin de conserver une activité sexuelle.

La qualité de l'activité des boucs ainsi obtenue est inférieure à celle qu'on observerait en pleine saison sexuelle (en termes d'expression du comportement, qualité et quantité de semence) mais le fait qu'ils restent actifs toute l'année, contre quelques mois seulement en lumière naturelle, permet une production très nettement supérieure sur l'année.

Ainsi, pour les races Alpine et Saanen, la production de semence a été multipliée par 10 depuis 1989. Cette augmentation s'explique d'une part par la mise en place du traitement lumineux au CIA Capgènes en 1995 et d'autre part par l'augmentation du nombre de boucs testé par an (de 47 à 80 entre 1998 et 2012). Le traitement lumineux a permis au centre d'étaler sa production sur toute l'année.

Production de semence ALPIN-SAANEN de 1989 à 2013

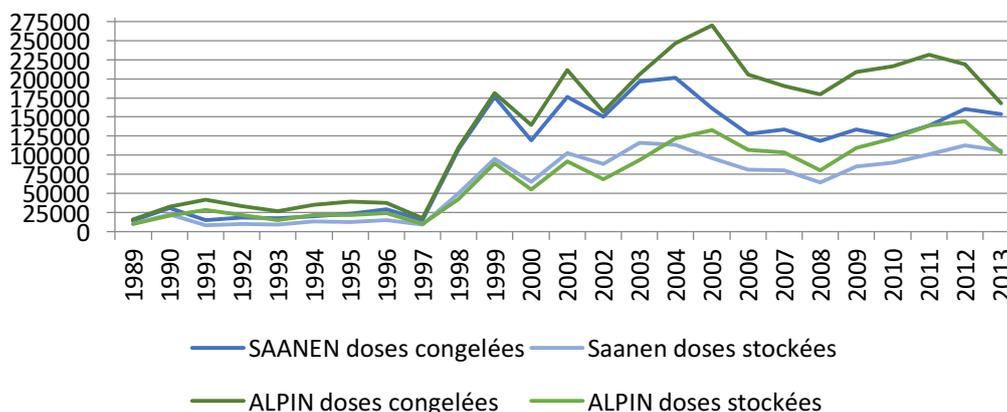


Figure 7 : Évolution de production de semence de boucs à Capgènes en nombre de doses

(Source : Tuauden M., Capgènes, CR France AgriMer Semence lavée/non lavée – campagne 2012-2013)

Le niveau de testostérone moyen obtenu avec les traitements lumineux abaisse l'activité des glandes annexes, et donc celle des glandes bulbo-urétrales produisant la lipase, sans inhiber le comportement sexuel des boucs. Nous avons souhaité explorer la possibilité de diminuer l'activité lipase néfaste de BUSgp60 en s'appuyant sur les traitements photopériodiques,

suffisamment pour permettre de cryoconserver la semence sans procéder à un lavage préalable.

II.A.2. Objectif du protocole

D'une part, il s'agit de suivre l'évolution de la testostéronémie et de l'activité lipase dans le plasma séminal des boucs au cours d'un cycle photopériodique artificiel complet, c'est-à-dire, au cours d'une période de jours longs suivie d'une période de jours courts et la comparer à celle des boucs en lumière naturelle.

D'autre part, il s'agit d'évaluer la pertinence de l'étape du lavage, en fonction de la composition de la semence de mâles, soumis à une photopériode artificielle dans le cas de la collecte pour des IA. En effet, la nécessité du lavage a été établie sur des boucs en saison naturelle dont les niveaux de testostérone et donc de BUS étaient très élevés. Dans la mesure où la composition de la semence varie en fonction des rythmes photopériodiques, on peut s'interroger sur la nécessité du lavage de la semence de boucs exposés à ces traitements.

II.A.3. Protocole expérimental

Trois groupes de boucs ont été soumis à trois TP :

- 10 boucs ont été soumis à la photopériode naturelle
- 8 boucs ont été soumis à une alternance 45JC/45JL
- 8 boucs ont été soumis à une alternance 60JC/60JL

Pendant un cycle complet, une prise de sang a été réalisée chaque semaine, le même jour à la même heure pour être dans les mêmes conditions expérimentales. La concentration plasmatique en testostérone a ensuite été dosée pour suivre son évolution au cours du cycle.

Les boucs ont été collectés à une fréquence de 2 sollicitations par semaine sur toute la période. Un minimum de 8 éjaculats par mâle répartis entre jours longs et jours courts ont été traités. Chaque éjaculat a été séparé en deux échantillons de semence : un échantillon directement dilué dans du lait et un échantillon préalablement lavé du plasma séminal avant dilution dans du lait (témoin). Les paillettes ont ensuite été identifiées par bouc et par éjaculat et bouchées avec de l'alcool poly-vinyle (APV) de couleur pour différencier les paillettes lavées des non lavées. L'activité de la lipase a été mesurée sur la semence pure prélevée dès la collecte pour chaque éjaculat.

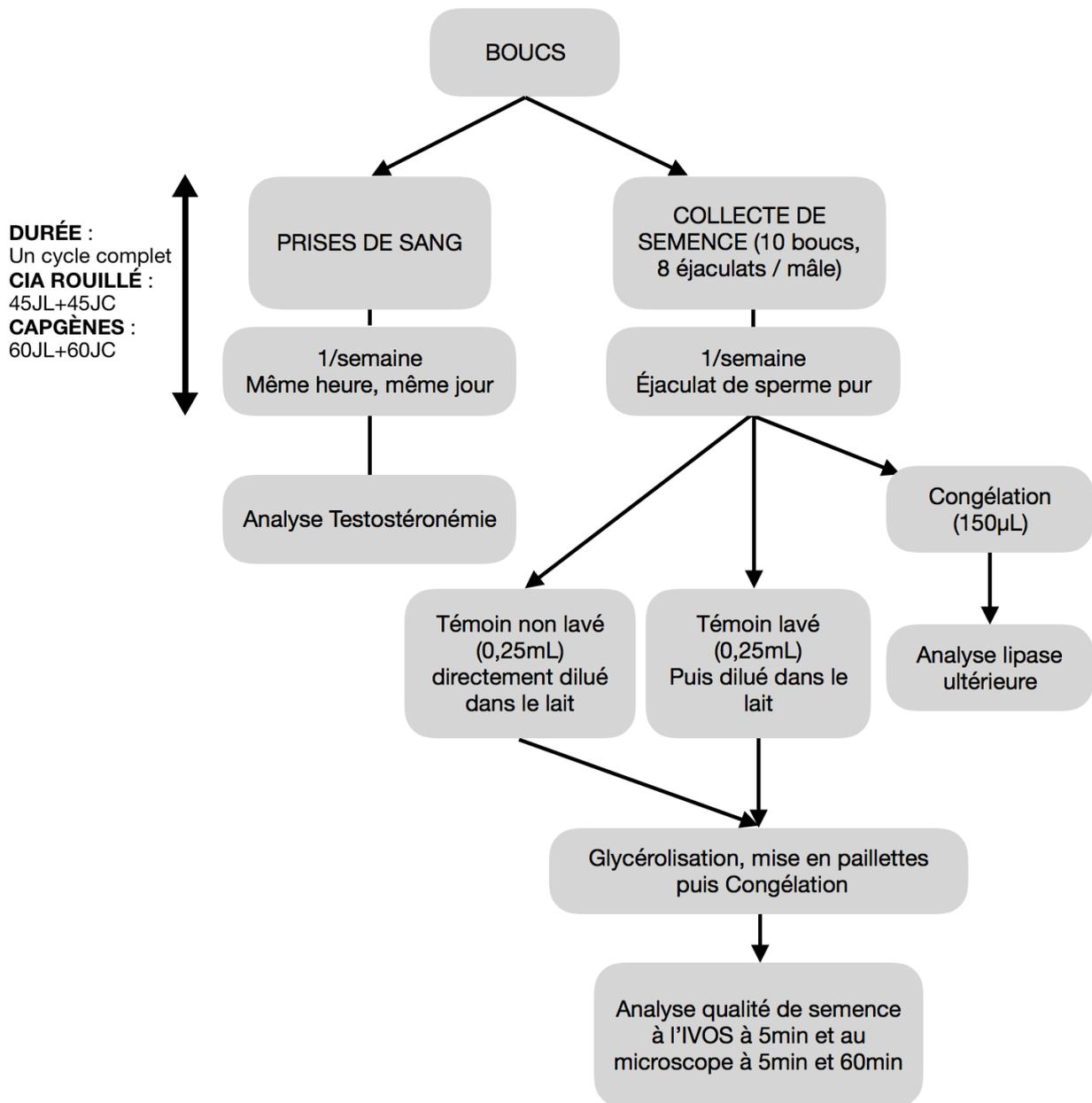


Figure 8 : Schéma du protocole expérimental (exemple de 10 boucs en photopériode naturelle)

II.B. Expérience 2 : Caractérisation de la part du spectre lumineux utile à la sécrétion de mélatonine

II.B.1. Définitions autour de la lumière

La lumière est une onde électromagnétique dont la couleur émise dépend de la longueur d'onde. Une longueur d'onde est la distance séparant deux valeurs d'amplitude maximales consécutives pour les ondes monochromatiques. La couleur émise par cette onde est perçue par le cerveau et dépend de la longueur d'onde dite dominante, c'est-à-dire celle qui transporte le plus d'énergie.

Un spectre lumineux est constitué d'un ensemble de longueurs d'onde et le spectre lumineux visible de la lumière blanche, c'est-à-dire, détectable par l'œil humain, s'étend de 400 à 700 nm et se décompose de la manière suivante (*Le spectre de la lumière, CNRS*) :

- Violet : 400 – 446 nm
- Bleu : 446 – 500 nm
- Vert : 500 – 578 nm
- Jaune : 578 – 592 nm
- Orange : 592 – 620 nm
- Rouge : 620 – 700 nm

L'éclairement du spectre lumineux visible, ou spectre visuel, est mesurable par un luxmètre. C'est un capteur qui reçoit puis convertit le signal lumineux en un signal électrique, ce qui entraîne l'affichage d'une mesure en lux. Le lux est l'unité de mesure de l'éclairement lumineux et correspond au flux lumineux reçu par une unité de surface. La distribution de l'énergie spectrale d'un éclairement lumineux peut être mesurée par un spectroradiomètre.

En élevage, les animaux sont soumis à un éclairage blanc (dont le spectre va du bleu au rouge), bien souvent fourni par des tubes fluorescents. Les connaissances actuelles sur les TP ne précisent pas quelle est ou quelles sont les domaines de longueurs d'onde qui ont un réel effet sur l'activité sexuelle des caprins.

Cependant, dans la bibliographie, certains éléments peuvent être relevés :

- La lumière qualifiée de « bleue » aurait un effet inhibiteur sur la sécrétion nocturne de mélatonine et contiendrait la longueur d'onde optimale d'absorption du photopigment mélanopsine, qui permet la perception de la durée du jour
- La lumière qualifiée de « rouge » ne serait pas visible par les animaux à faible intensité. Des entreprises commercialisent d'ailleurs des veilleuses à lumière « rouge » pour une utilisation nocturne en élevage (rondes). Pour autant, il n'existe à l'heure actuelle, aucune référence scientifique qui valide que ces veilleuses ne perturbent pas le rythme circadien des animaux. Cependant, si la lumière rouge n'est pas visible par les ruminants, elle ne devrait pas perturber la sécrétion de mélatonine.

Ces deux types de lumière semblent produire des effets opposés sur la sécrétion de mélatonine. Il serait alors intéressant de préciser ces effets afin d'avoir des recommandations plus fines sur l'utilisation des TP par les éleveurs.

II.B.2. Construction du protocole expérimental

II.B.2.1. Choix des boucs utilisés

Des statistiques inverses ont été faites à partir de données antérieures sur la mélatonine, afin de calculer le nombre nécessaire et suffisant de boucs à utiliser dans le protocole expérimental. Il a été montré qu'avec 6 boucs par lot, il était possible d'obtenir une puissance statistique de 87 % et un seuil de risque alpha de 0,05 pour un test bilatéral (H_0 : « pas de différence entre les paramètres du lot témoin et du lot testé » contre H_1 : « Paramètre du lot témoin \geq Paramètre du lot testé ou Paramètre du lot témoin \leq Paramètre du lot testé »). Les résultats montrent que trois lots de 6 boucs chacun permettent d'obtenir des données significativement différentes. Ainsi, ce sont 18 boucs du CIA de l'INRA de Rouillé qui seront soumis aux différents éclairages testés.

Afin de constituer les lots, la répartition des boucs se fera de manière aléatoire, mais en prenant en compte l'âge et l'ascendance des boucs. La variabilité génétique doit être la plus grande possible pour pouvoir espérer généraliser nos résultats au cheptel caprin et diluer

l'effet génétique. Si les résultats des dosages de mélatonine de nos boucs prévus en amont de l'expérimentation complète sont disponibles à temps, ils nous serviront à alloter nos boucs de manière plus fine. En effet, il existe une variabilité individuelle de la concentration de mélatonine plasmatique et donc de sa sécrétion (Zarazaga *and al*, 2010) qui serait liée à la taille de la glande pinéale. Les lots seront créés de façon à ce qu'il y ait une hétérogénéité intra-groupe et une homogénéité intergroupe afin d'éviter d'avoir tous les boucs avec des niveaux extrêmes dans un seul et même lot et de biaiser les résultats.

II.B.2.2. Bandes spectrales et intensités testées

Les animaux sont habituellement soumis à un éclairage par lumière blanche. La lumière blanche sera donc considérée comme bande spectrale témoin dans le protocole expérimental. Suite à ce qui a été dit dans le paragraphe III.1., la lumière « bleue » et la lumière « rouge » seront testées, et plus précisément les bandes spectrales suivantes :

- 450 +/- 25nm (bleu) : longueur d'onde optimale d'absorption du photopigment mélanopsine
- 620 +/- 10nm (rouge) : longueur d'onde ne perturbant normalement pas la sécrétion de mélatonine

Les recommandations actuelles concernant l'intensité lumineuse à fournir à hauteur des yeux des animaux sont de 200 lux. Cette intensité sera considérée comme intensité témoin dans le protocole expérimental.

Les mesures réalisées régulièrement dans les élevages du réseau expérimental de FERTICAP nous permettent de connaître les intensités habituellement perçues par les animaux :

- 70 lux : intensité moyenne mesurée dans les lots, dans les élevages
- 10 lux : intensité mesurée dans les zones éloignées des sources lumineuses en élevage

Il y a donc trois intensités (200, 70 et 10 lux) et trois couleurs (bleu, rouge, blanc) à tester. Tous les boucs impliqués dans l'expérimentation ont le même passé photopériodique. Ils ont reçu pendant leur carrière une alternance régulière de jours longs et de jours courts. Pour des questions pratiques horaires, l'expérimentation sera réalisée pendant des jours courts, au moins 15 jours après tout changement de rythme JL/JC.

Cependant, comme nous nous intéressons à cette étape à une réponse courte de la mélatonine à différents éclairages/obscurité (sur quelques heures), il n'y aurait de toute façon pas d'interférence avec les TP précédemment reçus sur du long terme.

Des analyses concernant différents designs expérimentaux ont été réalisées par l'UMR PRC afin de déterminer le design expérimental optimal à utiliser. Le choix s'est porté sur le carré gréco-latin qui est une superposition d'un carré latin « couleur » et d'un carré latin « intensité ». Il comporte deux variables aléatoires, le jour d'essai et le numéro du lot, et deux facteurs fixes, la couleur et l'intensité. Il nécessite quatre jours d'essai afin de tester toutes les combinaisons couleur-intensité possibles comme suit :

Lots boucs	Jours d'essai			
	J1	J2	J3	J4
Lot 1	Rouge 10 lux	Bleu 200 lux	Blanc 70 lux	Bleu 200 lux
Lot 2	Bleu 70 lux	Blanc 10 lux	Blanc 200 lux	Rouge 200 lux
Lot 3	Blanc 200 lux	Rouge 70 lux	Bleu 10 lux	Blanc 200 lux

II.B.2.3. Paramètres testés et fréquences des prélèvements

Le protocole expérimental vise à caractériser la lumière utile au contrôle de la sécrétion de mélatonine. Seule la réponse courte des animaux aux différents éclairages sera étudiée. Pour cela, les éclairages testés seront mis en place uniquement pendant deux heures au cours de la nuit.

La cinétique de sécrétion de deux hormones sera analysée : celle de la mélatonine, facteur d'intérêt principal afin de quantifier les effets des différents éclairages et de juger de l'efficacité des traitements lumineux, et celle du cortisol, hormone stéroïde sécrétée par la glande surrénale sous la dépendance de l'ACTH hypophysaire en cas de stress, afin de déterminer si certains éclairages sont susceptibles de générer un stress chez les animaux.

La cinétique de sécrétion de ces hormones sera suivie par des dosages sanguins. Cette méthode est la plus répandue chez les caprins et il existe à l'heure actuelle de nombreuses données fiables auxquelles comparer nos futurs résultats.

Pour ne pas biaiser les résultats, les prises de sang dans l'obscurité se feront à l'aide de lampes frontales modifiées de façon à ce que le flux apporté ne soit pas perçu par les boucs mais permette aux opérateurs de voir leurs mains pour travailler. Les analyses au spectroradiomètre et au luxmètre ont montré que ce type de lampe permet d'être sous le seuil de 13 lux en deçà duquel la sécrétion de mélatonine nocturne n'est pas impactée. Il y a donc en théorie maintien de sa sécrétion.



Figure 9 : Lampe frontale équipée d'un filtre rouge très occultant, de façon à ne laisser passer qu'un flux faible et invisible par les boucs

La mélatonine et le cortisol étant deux hormones, leur concentration plasmatique varie très vite. Afin d'avoir une étude fine de leurs variations, il sera nécessaire d'avoir un pas réduit entre chaque prise de sang, de l'ordre de 15 à 20 minutes. Avec un intervalle de mesures supérieur à 20 minutes, il serait compliqué d'obtenir une moyenne horaire fiable avec uniquement deux mesures par heure. En effet, les niveaux de mélatonine peuvent être indétectables par nos appareils de mesure, puisque les niveaux plasmatiques sont très bas chez les caprins. Par conséquent, les probabilités d'avoir des résultats exploitables sont amoindries en augmentant le pas de mesure.

Selon le pas de mesure choisi (15min ou 20min), il y aura donc entre 22 et 29 prises de sang par jour, et par bouc. Celles-ci se feront au niveau des veines jugulaires. Or, il a été montré qu'il existait une variabilité intra-bouc du niveau de mélatonine plasmatique entre la veine jugulaire droite et la veine jugulaire gauche (Zarazaga *and al*, 2010). Les prises de sang se feront donc toujours dans la même veine jugulaire dans le but d'effacer cette variabilité.

Dans une volonté de préservation des veines jugulaires, les jours d'essai seront séparés chacun par une ou deux semaines. Le protocole expérimental s'étalera donc sur un ou deux mois.

Pour que chaque bouc puisse être son propre témoin, les dosages de mélatonine et de cortisol commenceront en amont de l'éclairage testé. Il y aura tout d'abord une phase de test sous éclairage à la lumière blanche habituellement utilisée dans le bâtiment, puis une première phase d'obscurité, puis deux heures pendant lesquelles l'éclairage expérimental sera testé et enfin, une deuxième phase d'obscurité pour étudier ces mêmes paramètres de la cinétique de mélatonine.

Les jours d'essai se dérouleront donc comme suit :

- De 11h à 12h (éclairage tubes fluorescents classiques) : Obtention d'un témoin de la sécrétion de mélatonine plasmatique des boucs exposés à la lumière blanche
- De 12h à 14h (obscurité) : Définition du délai et de la vitesse de démarrage ainsi que de l'amplitude de la sécrétion de mélatonine plasmatique des boucs après mise à l'obscurité.
- De 14h à 16h (éclairage selon les modalités définies) : Suivi des niveaux de mélatonine plasmatique pour répondre aux questions suivantes
 - Y a-t-il diminution de ces niveaux ? Est-elle rapide ou non ?
 - Y a-t-il des variations significatives de ces niveaux en fonction des différents éclairages ?
- De 16h à 18h (obscurité) : Suivi de la reprise de la sécrétion de mélatonine
 - Capacité des boucs à sécréter de nouveau de la mélatonine ?
 - Latence et vitesse de la reprise de sécrétion ?

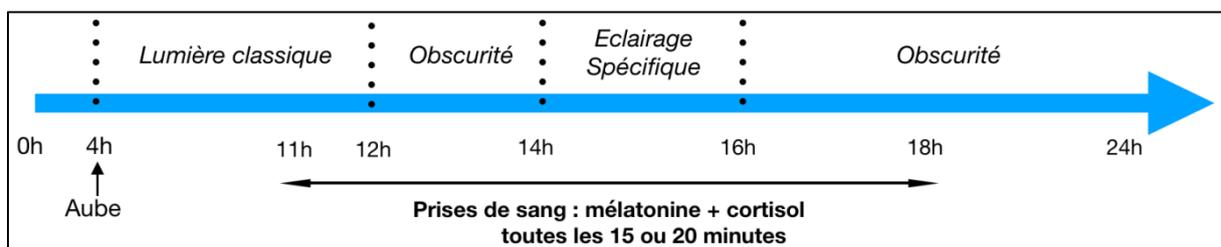


Figure 10 : Déroulé d'un jour d'essai

II.B.2.4. Bâtiment et installations lumineuses

Le bâtiment actuel est composé de trois zones d'hébergement contenant six cases individuelles (communicantes si les boucs se mettent debout) pour les deux premières zones et douze cases pour la troisième pièce comme schématisé ci-dessous (figure 11). Ainsi, vingt-deux boucs seront présents durant les traitements lumineux mais seulement dix-huit boucs feront partie du protocole.

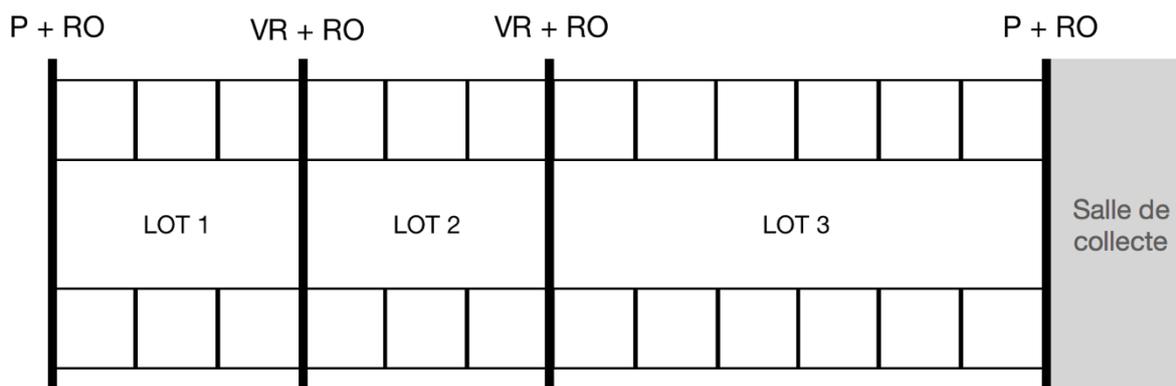


Figure 11 : Bâtiment d'expérimentation et étanchéité lumineuse

(P : Porte, RO : Rideau occultant, VR : Volet roulant)

Les trois zones sont séparées par des rideaux occultants et des volets roulants, ce qui les rend indépendantes entre elles. Les fenêtres sont étanches à la lumière extérieure, ce qui permet de simuler les conditions expérimentales photopériodiques souhaitées sans lumière naturelle parasite.

Pour préserver l'indépendance et l'étanchéité lumineuse entre les pièces, la circulation des agents sera limitée à une seule personne chargée de transporter régulièrement les échantillons jusqu'au laboratoire, afin de procéder rapidement à la suite du traitement (centrifugation, congélation). Cette circulation sera possible sans perturber le protocole grâce aux doubles rideaux occultants rajoutés de part et d'autre des volets qui ne seront ouverts qu'à 1m du sol pour prévenir toute pollution lumineuse d'un lot à l'autre.

Pour une question pratique, la pièce contenant les 12 cases individuelles sera constamment éclairée avec le témoin « blanc 200 lux », ce qui limite le déplacement des installations lumineuses au cours de l'essai. Ce sont les lots de boucs qui seront préférentiellement déplacés d'une zone à l'autre (les cases étant préalablement curées avant les déplacements) selon les jours et traitements lumineux à tester.

Des étudiants de l'ENSIP (École Normale Supérieure des Ingénieurs de Poitiers) ont réalisé une étude sur les installations lumineuses dans le bâtiment boucs actuel et sur celles du futur bâtiment, aujourd'hui en construction. L'objectif de leur travail était de faire une simulation de la future installation lumineuse en se basant sur des comparaisons valeurs simulées / valeurs mesurées du bâtiment actuel afin d'obtenir des conditions d'éclairage semblables.

Ainsi, grâce aux mesures et photos réalisées, ils ont pu cartographier les flux puis modéliser le bâtiment à l'identique sur le logiciel de modélisation des éclairages, Dialux. Les différents points de mesure ont permis de montrer une hétérogénéité d'éclairage au sein du bâtiment, l'intensité varie de 171 à 795 lux avec une moyenne de 425 lux, sans pour autant que cela soit réellement perceptible à l'œil humain.

Après avoir validé le mode de simulation, en confrontant les valeurs mesurées aux valeurs théoriques obtenues par l'intégration des données techniques des fabricants des luminaires existants au logiciel, les étudiants ont pu, grâce aux plans du nouveau bâtiment, créer tout un projet d'éclairage répondant aux mêmes caractéristiques que le bâtiment actuel (intensité moyenne de 400 lux, intensité minimale requise de 200 lux en tout point de l'installation, uniformité supérieure à 0,4) malgré une configuration différente. La grande différence réside dans le type d'éclairage utilisé : dans le bâtiment actuel, ce sont des tubes fluorescents qui sont utilisés et des LED dans le nouveau bâtiment. En effet, la fabrication des tubes fluorescents prenant fin d'ici 2020, seules les LED resteront sur le marché. Or, les LED et les tubes fluorescents ont des spectres d'émission très différents, ce qui rend difficile de trouver des éclairages similaires. Le protocole expérimental qui sera mis en place dans le bâtiment

actuel va permettre de déterminer l'intensité et la gamme de longueurs d'onde adéquates pour l'activité sexuelle des animaux. Une fois ces paramètres connus, il sera possible de personnaliser complètement les LED à installer sur le nouveau bâtiment.

Pour le protocole expérimental, en concertation avec l'équipe d'écophysiologie de l'URP3F, nous avons choisi dans un premier temps d'utiliser des tubes fluorescents blancs classiques et de couleur (rouge et bleu) afin de tester nos différentes gammes de longueurs d'onde et d'y ajouter des filtres spécifiques pour grader l'intensité et sélectionner les gammes de longueurs d'onde.

II.B.2.5. Bien-être animal et questions éthiques

L'expérimentation animale est soumise à réglementation. Dans cet essai, les exigences de remplacement, réduction et raffinement seront prises en compte comme suit :

- **Remplacement** : il n'existe pas, à l'heure actuelle de méthode permettant d'éviter ou de remplacer l'utilisation de boucs pour décrire comment les hormones mélatonine et cortisol sont sécrétées pendant l'exposition à différents traitements lumineux et caractériser la part « utile » du spectre lumineux impliquée dans le contrôle de la saisonnalité de la reproduction des caprins. Un remplacement relatif (c'est-à-dire remplacer les boucs par des animaux ayant un moindre potentiel de perception de la douleur, comme certains invertébrés) n'est pas non plus envisageable dans la mesure où la sensibilité aux traitements lumineux, la sécrétion de mélatonine associée et leurs variations sont propres à chaque espèce.
- **Réduction** : Un calcul du nombre de sujets nécessaires par statistiques inverses a été réalisé afin d'estimer au plus juste le nombre d'animaux à inclure dans le projet qui se trouve être de 6 animaux par lot, soit un total de 18 animaux. Le nombre et la fréquence des prises de sang pour le suivi hormonal a été réduit au minimum nécessaire et suffisant à l'établissement de profils interprétables. Les prises de sang pour dosage de la mélatonine et du cortisol ont été regroupées afin de limiter le nombre de prélèvements par animal (2 dosages réalisés à partir d'une seule introduction d'aiguille pour la prise de sang). Il est recommandé de ne pas prélever plus de 10% du volume sanguin total en 1 fois. Le volume maximum de sang prélevé en 1 journée est de 145mL, ce qui est 5 fois inférieur au seuil recommandé estimé pour un bouc de 90kg en moyenne.
- **Raffinement** : Afin de s'assurer d'une bonne contention et de limiter la durée de prélèvements et le stress, la contention et les prélèvements seront réalisés systématiquement par 2 personnes. Une attention particulière sera portée aux veines jugulaires des animaux notamment lors des prélèvements sanguins répétés pour repérer tout signe éventuel de phlébite. Le cas échéant, un baume antiseptique et cicatrisant sera appliqué en massage sur les veines. Par ailleurs, les animaux sont surveillés de façon journalière pendant toute la durée des protocoles (surveillance habituelle pratiquée dans le troupeau expérimental). En cas de symptôme suspect, une intervention vétérinaire a lieu et l'animal est sorti du protocole si nécessaire. De plus, comme les animaux sont habitués à être manipulés et à toute sorte de bruits, ils seront préalablement tondus au niveau des jugulaires pour faciliter les prélèvements.

Afin de diminuer les actes invasifs sur nos animaux, la possibilité d'utiliser les dosages salivaires a été abordée. Cependant, cette possibilité a rapidement été mise de côté principalement pour deux raisons :

- Il n'existe actuellement aucune base de données sur des prélèvements salivaires de mélatonine et cortisol chez les caprins. Nos résultats ne seront donc pas comparables et vérifiables avec d'autres données existantes ;
- La mélatonine et le cortisol sont deux hormones libérées dans le sang quasi instantanément suite à un stimulus. Or, nous ne connaissons pas le délai nécessaire pour que les variations de concentration de ces hormones dans la salive soient aussi détectables que les plasmatiques. À l'heure actuelle, aucune étude en caprins n'a été faite pour avoir une comparaison salive/plasma. De plus, les études comparatives faites sur la concentration de la LH dans le plasma sanguin et dans la salive montrent qu'il existe une grande perte de précision dans la salive.

Nous avons donc décidé d'effectuer les dosages hormonaux à partir d'échantillons sanguins, certes plus invasifs, mais montrant des intérêts et une efficacité plus importants pour notre étude.

Une représentante de la structure bien-être animal de l'INRA sera présente durant toute l'expérience afin de rendre compte du déroulement de chaque jour d'essai. Si des problèmes devaient se présenter, ils seraient alors notifiés afin de trouver des solutions et de les éviter les jours suivants.

III. RÉSULTATS

III.A. Résultats de l'expérience 1

Dans cette étude, 37 facteurs quantitatifs sur la qualité du sperme, l'activité lipase et la testostéronémie et 5 facteurs qualitatifs (types de photopériode, types de jours JL/JC, N° bouc, Centre d'étude, Date) ont été étudiés. Seront présentés et analysés ici uniquement la testostéronémie, l'activité lipase, le volume de la semence, la concentration en spermatozoïdes et les différents cas de mobilité et motilité des spermatozoïdes.

En routine au CIA, les données de testostérone et d'activité lipase dans la semence ne sont pas collectées. Il nous était donc impossible de vérifier l'homogénéité des lots avant le début de l'essai. De plus, deux autres facteurs sont à préciser. D'une part, en 2005, les expérimentateurs de l'INRA n'ont pas eu d'autres choix que d'utiliser les boucs que Capgènes leur avait mis à disposition. D'autre part, les boucs exposés à une alternance 60JL/60JC au sein de Capgènes sont majoritairement de jeunes animaux en prétestage, potentiellement plus actifs sexuellement que les boucs exposés à une alternance 45JL/45JC au CIA de l'INRA, qui sont plus âgés et dont la production spermatique est moins bonne.

Les analyses ont été effectuées sur trois groupes de boucs, deux de 8 boucs et un de 10 boucs. Dans un premier temps, des analyses descriptives ont été faites sur les variables étudiées puis des analyses de variance à un ou deux facteurs ont été réalisées afin de tester la significativité des effets de deux variables qualitatives, la photopériode et le lavage, qui se déclinent en trois modalités chacune (« photopériode naturelle, photopériode 45JL/45JC et photopériode 60JL/60JC » // « lavé, non lavé, VX ») sur les différents facteurs quantitatifs.

III.A.1. Testostéronémie

La testostéronémie a été étudiée en comparant les valeurs mesurées sur les boucs exposés à une alternance 45JL/45JC (nommés « boucs 45 » par la suite) et sur les boucs exposés à une alternance 60JL/60JC (nommés « boucs 60 » par la suite). Les résultats sont présentés Figure 10.

Il semblerait que sur la totalité du cycle, les boucs 60 aient un niveau de testostérone global moyen plus élevé de 17% (8,41 ng/ml contre 7,018 ng/ml). Les niveaux sont également plus élevés en jours longs (+23%) et en jours courts (+13%).

La répartition des données de testostéronémie selon le traitement photopériodique montre que le passage des jours longs aux jours courts chez les boucs 45 entraîne une plus forte hausse de la testostéronémie que chez les boucs 60.

Les différences de testostéronémie entre les jours longs et les jours courts sont de 36% pour les boucs 60 et de 24% pour les boucs 45. Il semblerait donc que le passage d'une alternance de 60JL/60JC à une alternance 45JL/45JC diminue les variations du taux de testostérone plasmatique (TTP).

De plus, les boucs 60 semblent avoir une plus grande variabilité intra-groupe de la testostéronémie que les boucs 45.

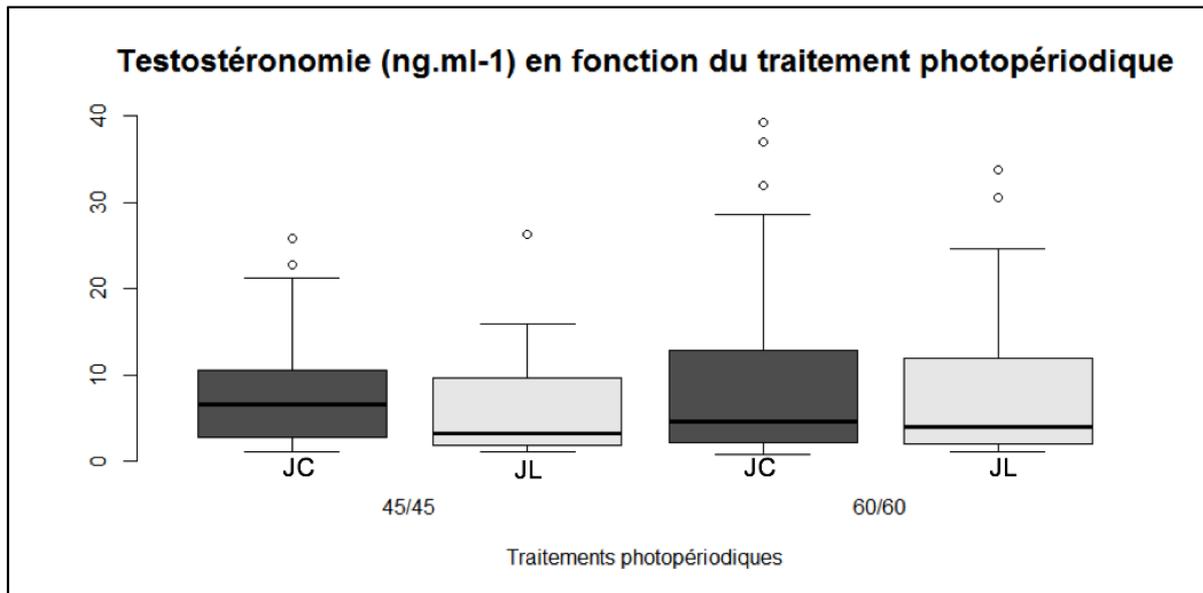


Figure 12 : Répartition des données de testostéronémie en fonction du traitement photopériodique

III.A.2. Activité lipase

L'activité lipase a été étudiée en comparant les mesures hebdomadaires sur les éjaculats des boucs 45 et des boucs 60.

Il semblerait que sur la totalité du cycle, les boucs 60 aient une activité lipase globale moyenne plus élevée de 29% (91,54 U/ml contre 64,74 U/ml chez les boucs 45). L'activité lipase est également bien plus élevée en jours longs (51%) mais plus faible en jours courts (-3%) chez les boucs 60 que chez les boucs 45.

La répartition des données d'activité lipase selon le traitement photopériodique montre que le passage des jours longs aux jours courts chez les boucs 45 n'apporte pas de modification de l'activité moyenne de la lipase alors que chez les boucs 60, ce passage entraîne une nette augmentation de l'activité moyenne de la lipase.

Les différences de l'activité lipase entre les jours longs et les jours courts sont de 51% pour les boucs 60 et de 2,5% pour les boucs 45. Il semblerait donc que l'exposition à une alternance plus courte (45JL/45JC) diminue les variations de l'activité lipase par rapport à une alternance 60JL/60JC.

De plus, les boucs 60 semblent avoir une plus grande variabilité intra-groupe de l'activité lipase que les boucs 45.

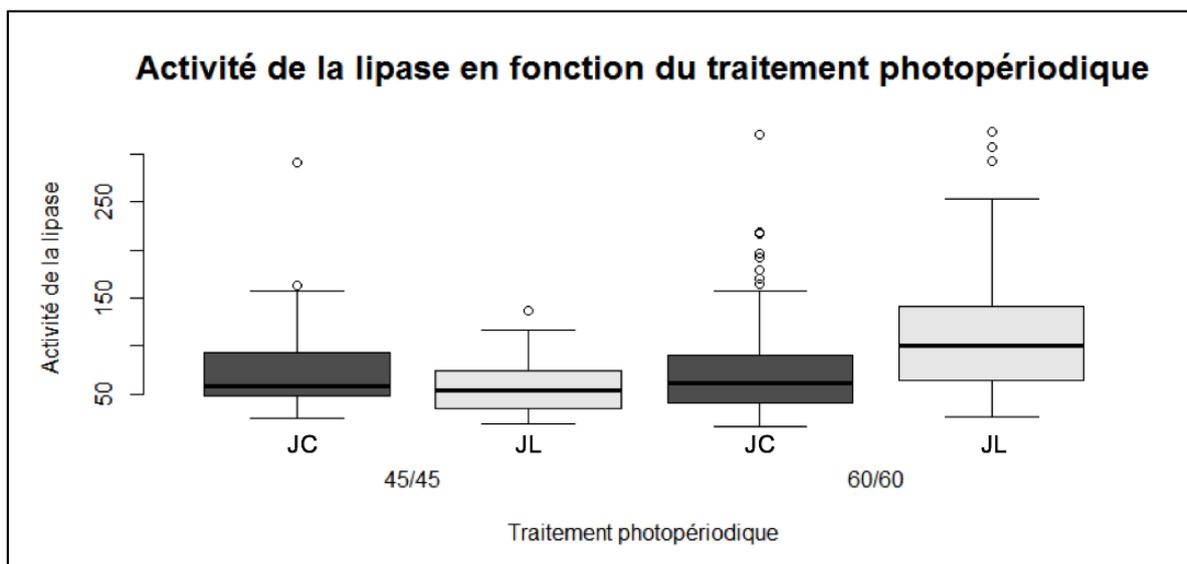


Figure 13 : Répartition des données de l'activité de la lipase en fonction du traitement photopériodique

Les données montrent également que dans le lot boucs 45, certains boucs ont une activité lipase plus importante en JL et d'autres plus importante en JC.

Hypothèse : les variations des sécrétions des glandes bulbo-urétrales ne sont pas suffisamment importantes entre les jours longs et les jours courts pour induire une différence d'activité lipase chez les boucs soumis à un rythme 45JL/45JC. Sous cette alternance photopériodique rapide, un profil net de sécrétion des glandes bulbo-urétrales n'a pas le temps de se mettre en place.

III.A.3. Evolution conjointe de la testostéronémie et de l'activité lipase

Les évolutions temporelles conjointes du TTP et de l'activité lipase des boucs 45 (figure 14) et des boucs 60 (figure 15) ont été représentées. Le même type de variations (avec différentes fréquence et amplitude) est observé sous lumière naturelle (cf. Figure 5). Le TTP et l'activité lipase suivent les mêmes variations, le pic de testostérone semble se produire en avance d'une phase θ par rapport au pic d'activité lipase. Il serait intéressant d'étudier la dépendance entre ces deux mesures. L'hypothèse sous-jacente est que l'activité lipase dépend du TTP et varie dans le même sens.

De plus, le pic de TTP et d'activité lipase sont moins marqués et atteignent des valeurs plus faibles pour les boucs 45 (TTP : 15 ng/ml et AL : 108 U/ml) que pour les boucs 60 (TTP : 28 ng/ml et AL : 160 U/ml).

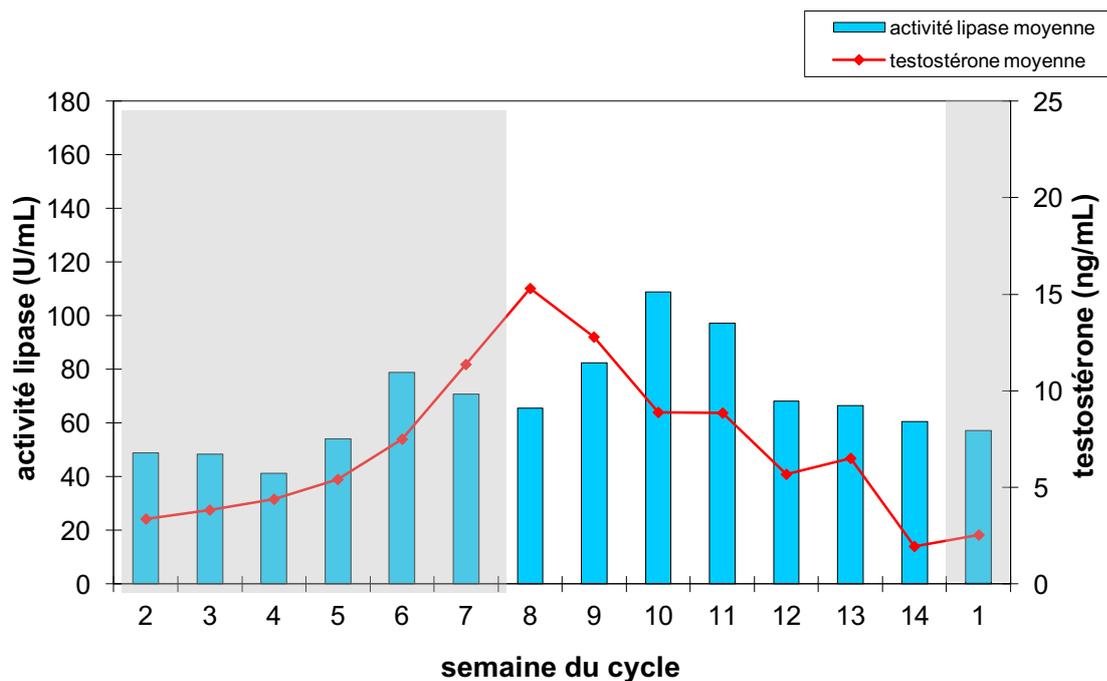


Figure 14 : Évolution temporelle conjointe du TTP et de l'activité lipase sous alternance 45JL/45JC

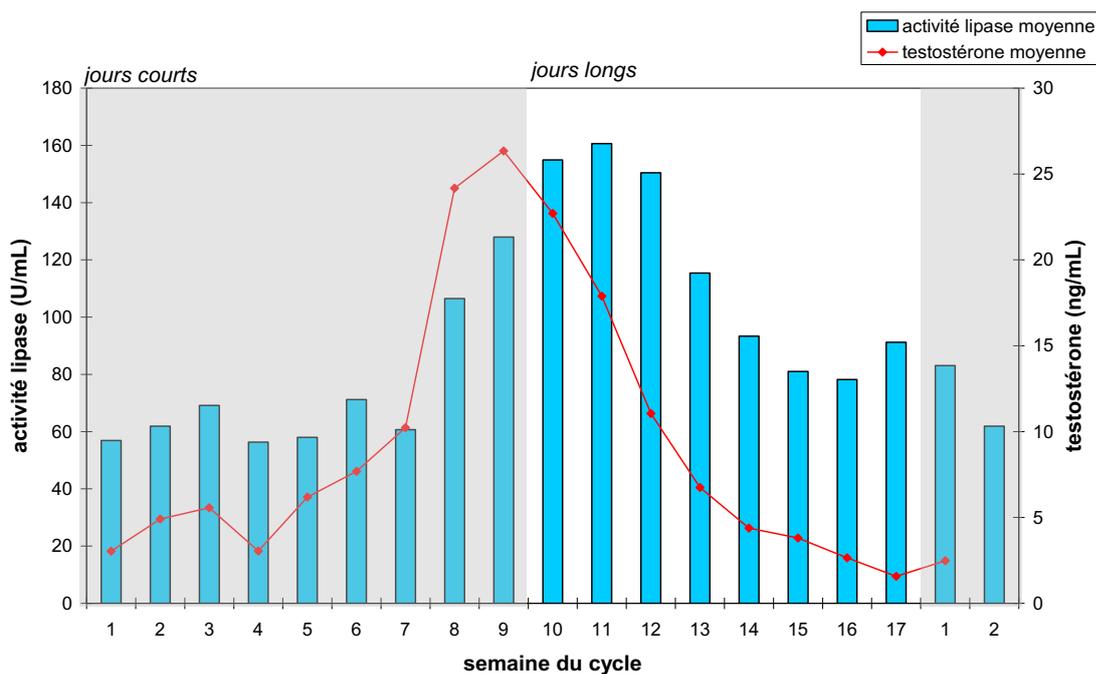


Figure 15 : Évolution temporelle conjointe du TTP et de l'activité lipase sous alternance 60JL/60JC

Deux analyses de variance à deux facteurs ont été réalisées afin de tester l'effet de deux variables qualitatives, la photopériode et le type de jours, qui se déclinent en deux modalités chacune (« 45JL/45JC, 60JL/60JC » et « Jours longs, Jours courts ») sur le TTP et l'activité lipase.

L'analyse statistique montre que la photopériode, le type de jours et l'interaction des deux à un effet significatif sur l'activité de la lipase mais pas sur le TTP. Ceci est surprenant, puisqu'il existe des variations de testostéronémie en fonction des jours longs et des jours courts et que les variations de l'activité lipase sont liées aux variations des glandes bulbo-urétrales, elles-mêmes liées à la testostéronémie.

Ce résultat pourrait être dû au nombre réduit de boucs utilisés (seulement 8 par groupe) et à la variabilité individuelle des boucs.

III.A.4. Qualité de la semence

Dans ce paragraphe, différents facteurs seront étudiés pour répondre à deux questions :

- Le lavage de la semence est-il pertinent pour chaque rythme photopériodique ?
- Y a-t-il des différences induites par les différents rythmes photopériodiques ?

En premier lieu, une analyse de la corrélation entre variables a été réalisée afin de pouvoir réduire le nombre de variables d'étude.

L'axe de droite correspond à la valeur de corrélation entre deux variables. Le coefficient 0 signifie que deux variables ne sont pas corrélées linéairement. Plus les coefficients sont proches de 1 et -1, plus la corrélation linéaire entre les deux variables est forte. On considèrera que les corrélations comprises entre 0,5 et 1 / -0,5 et -1 sont fortement corrélées. Plus les points sont épais et bleu/rouge foncés, plus les variables sont corrélées, positivement ou négativement.

Les treize premières variables correspondent à la motilité (qualité du déplacement) et à la mobilité (capacité à se mouvoir) des spermatozoïdes à différents moments et la caractérisation de leurs déplacements évaluée à l'analyseur d'image. Elles sont toutes corrélées entre elles (corrélations comprises entre 0,7 et 1), seules les facteurs motilité et mobilité seront conservés dans la suite de l'étude.

Les autres corrélations n'apportent pas d'information pertinente.

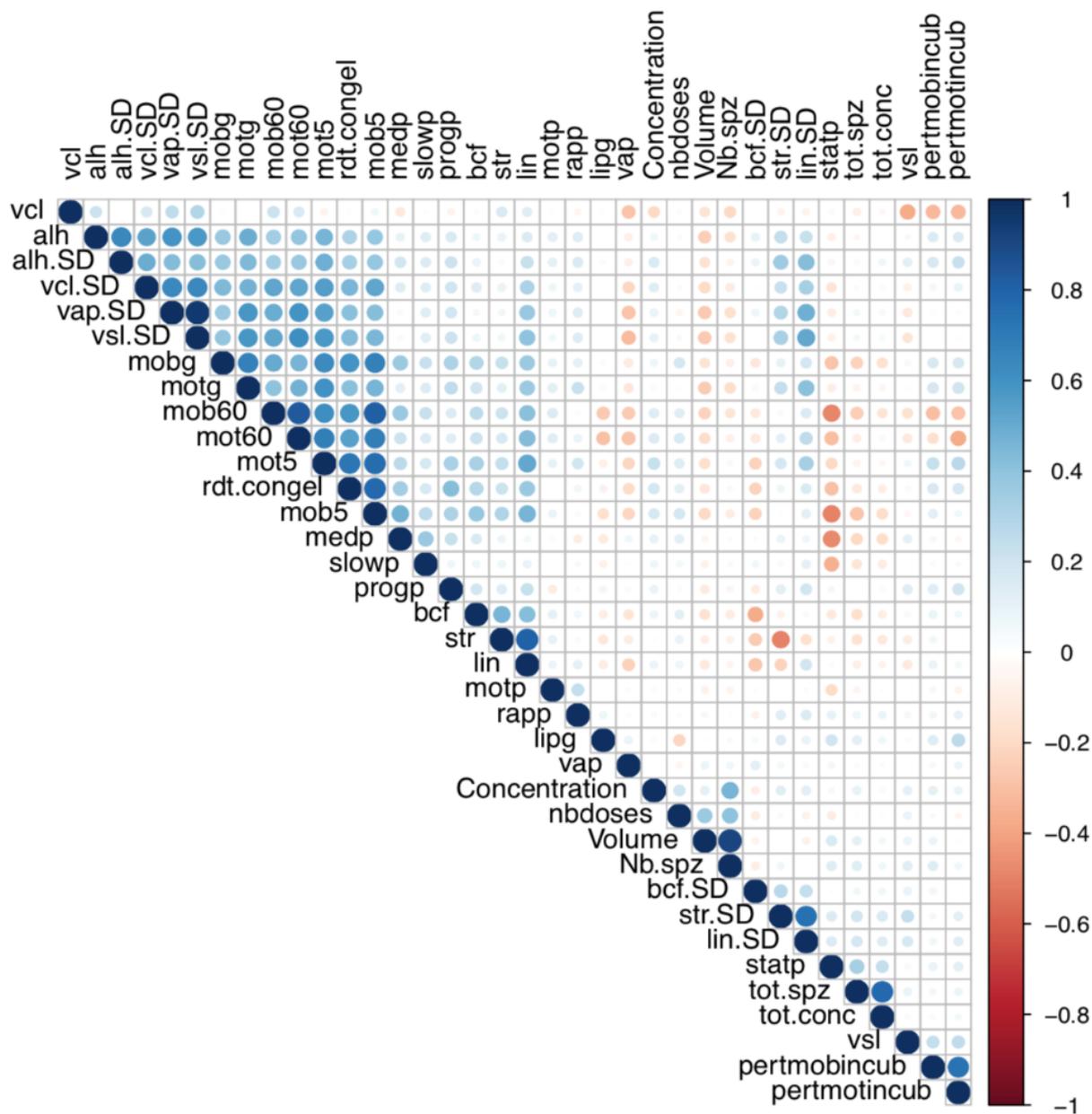


Figure 16 : Matrice de corrélations entre variables à étudier

La motilité et la mobilité des spermatozoïdes sont altérées par un ou plusieurs facteurs dans le plasma séminal lorsque la semence non lavée est décongelée. Les variations de ces deux paramètres vont être décrites ci-dessous pour voir comment ils évoluent selon le rythme photopériodique auxquels sont soumis les boucs et confirmer ou réfuter l'intérêt du lavage de la semence.

III.A.4.1. Mobilité des spermatozoïdes

Trois paramètres de mobilité ont été analysés : la mobilité avant glycérolisation (mobg) et congélation, la mobilité à 5 minutes après décongélation (mob5) et la mobilité à 60 minutes après décongélation (mob60).

Concernant la mobilité avant la glycérolisation, les données montrent des écarts compris entre 2% et 6% selon les rythmes photopériodiques pour la semence non lavée et des écarts compris entre 8 et 18% en semence lavée.

Concernant la mobilité à 5 minutes après décongélation, les résultats montrent :

Premier constat : l'amplitude des variations est quasiment similaire pour tout type de rythme, avec ou sans lavage.

Deuxième constat : il semblerait que, semence lavée ou non, la mob5 soit plus élevée chez les boucs 60. Les valeurs moyennes présentent des variations de l'ordre de 20% en semence non lavée et de 32% en semence lavée entre boucs 45 et boucs 60. Les écarts sont du même ordre entre lumière naturelle et boucs 60. Cependant, les écarts sont compris entre 6% et 2% entre boucs 45 et les boucs sous lumière naturelle.

Troisième constat : Les baisses de mobilité concernant le passage de la semence lavée à la semence non lavée semblent similaires pour les trois rythmes photopériodiques.

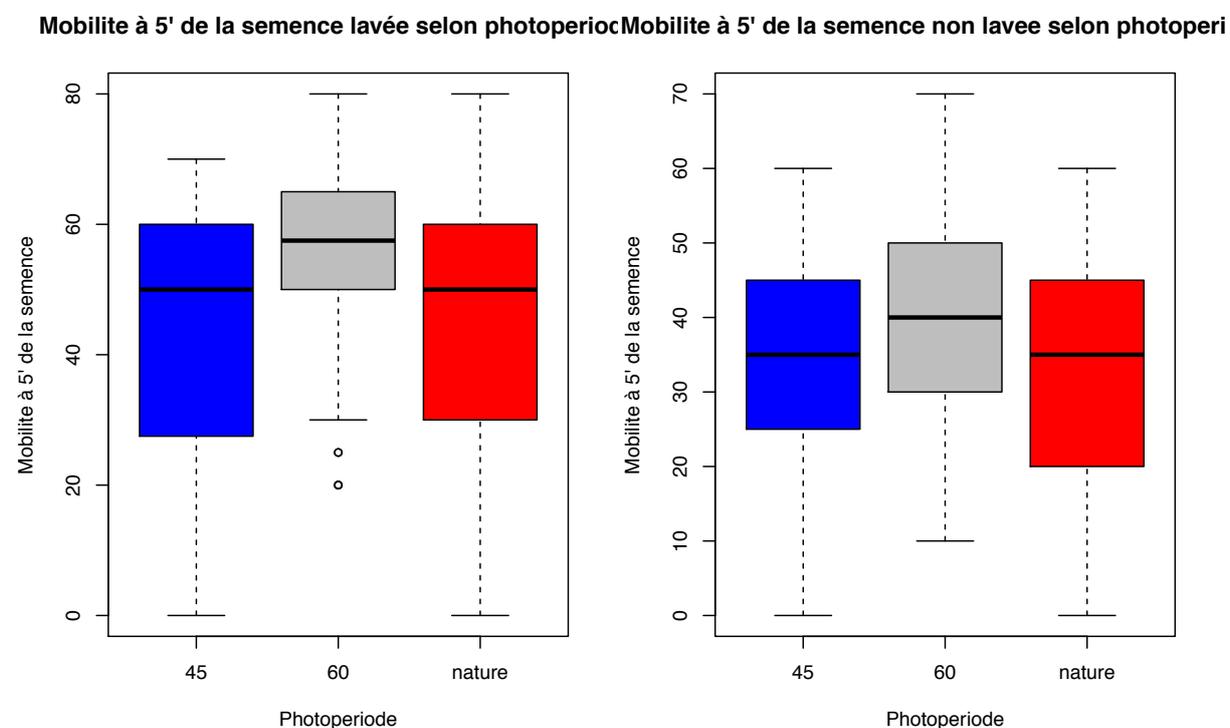


Figure 17 : Mobilité à 5 min de la semence lavée et non lavée selon la photopériode

Concernant la mob 60, les résultats montrent que :

- Premier constat : la variabilité des données est plus importante sur semence lavée, sous alternance 45JL/45JC et sous lumière naturelle.
- Deuxième constat : Comme pour la mob5, la mob60 est meilleure sous conditionnement 60JL/60JC en semence lavée et non lavée. Elle atteint 42% en moyenne pour les boucs 60 en semence lavée, contre 24% pour les boucs 45 et 22% pour les boucs sous lumière naturelle. Elle atteint 22% pour les boucs 60 en semence non lavée contre 12% pour les boucs sous lumière naturelle et les boucs 45. Les écarts de mobilité à 60 minutes, en semence lavée ou non lavée, sont donc

de l'ordre de 75% entre boucs 45 et boucs 60, de l'ordre de 82% entre boucs 60 et boucs sous lumière naturelle et de 5% entre boucs 45 et boucs sous lumière naturelle. Les données de mob60 sont quasi similaires entre les boucs 45 et les boucs sous lumière naturelle.

Mobilite à 60' de la semence lavée selon photoperio Mobilite à 60' de la semence non lavée selon photoper

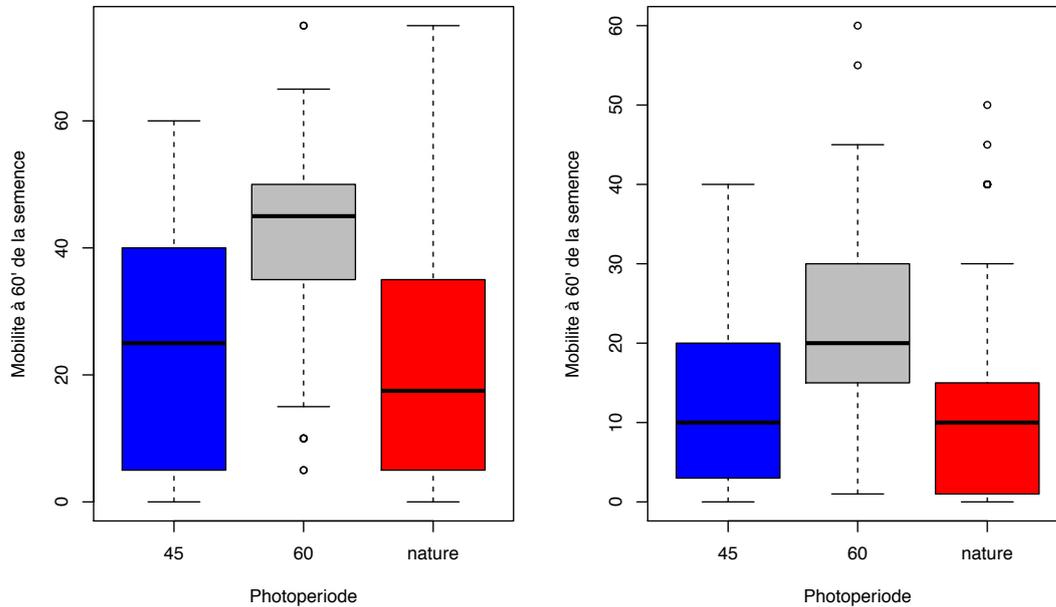


Figure 18 : Mobilité à 60 min de la semence lavée et non lavée selon la photopériode

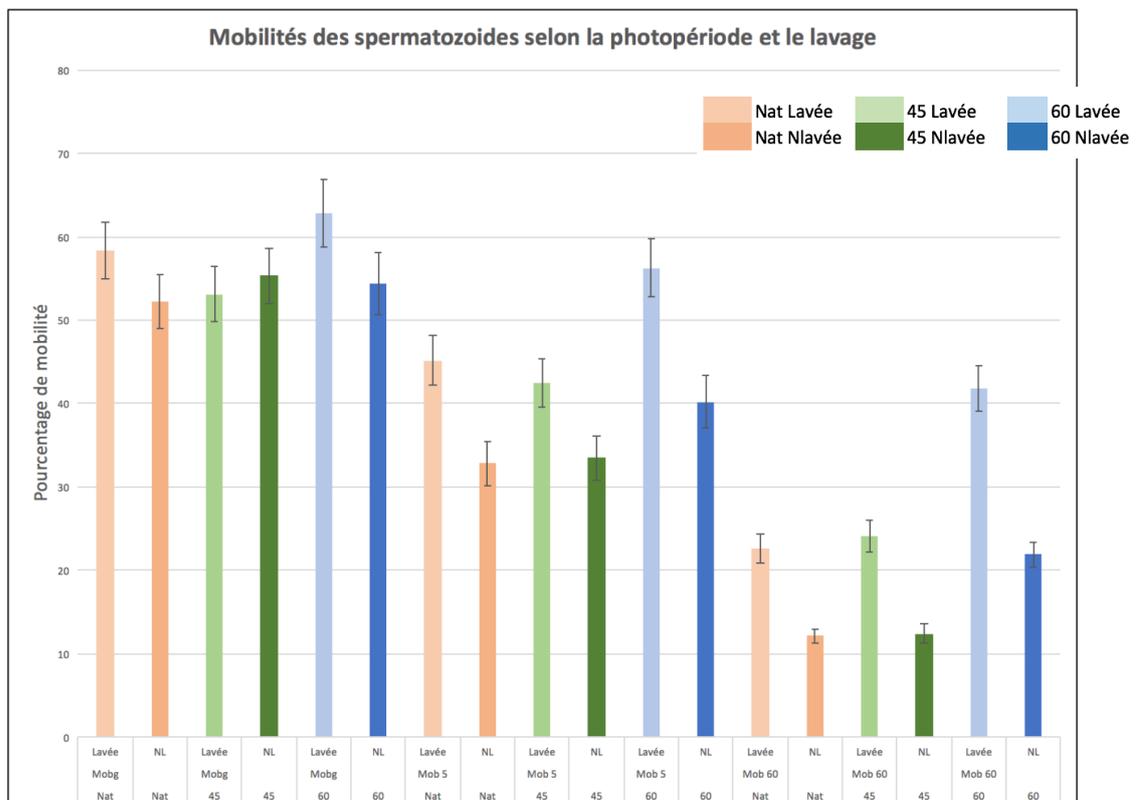


Figure 19 : Mobilités des spermatozoïdes selon la photopériode et le lavage

Les tests statistiques montrent qu'en semence non lavée, l'effet de la photopériode n'est pas significatif sur la mobilité avant glycérolisation. L'alternance 60JL/60JC a cependant un effet positif sur la mobilité à 5 min et la mobilité à 60min.

III.A.4.2. Motilité des spermatozoïdes

Trois paramètres de motilité ont été analysés : la motilité avant glycérolisation (motg), la motilité à 5 minutes après décongélation (mot5) et la motilité à 60 minutes après décongélation (mot60).

Concernant la motilité avant la glycérolisation, les données montrent des écarts compris entre 2% et 23% selon les rythmes photopériodiques en semence non lavée et des écarts compris entre 1% et 16% en semence lavée. La motg est la plus élevée chez les boucs 60 et la plus faible chez les boucs 45.

Concernant la motilité à 5 minutes après décongélation, les résultats montrent :

- Premier constat : l'amplitude des variations est plus importante sur semence non lavée qu'en semence lavée.
- Deuxième constat : il semblerait que, semence lavée ou non, la mot5 soit plus élevée chez les boucs 60. Les valeurs moyennes présentent des variations de l'ordre de 15% à 20% en semence lavée et non lavée entre boucs 45 et boucs 60. Les écarts sont du même ordre entre lumière naturelle et boucs 60. Cependant, les écarts sont compris entre 3% et 4% entre boucs 45 et boucs sous lumière naturelle.
- Troisième constat : Les baisses de motilité dues à l'absence de lavage de la semence sont avérées pour les boucs 60 mais n'existent pas pour les boucs 45 et les boucs sous lumière naturelle.

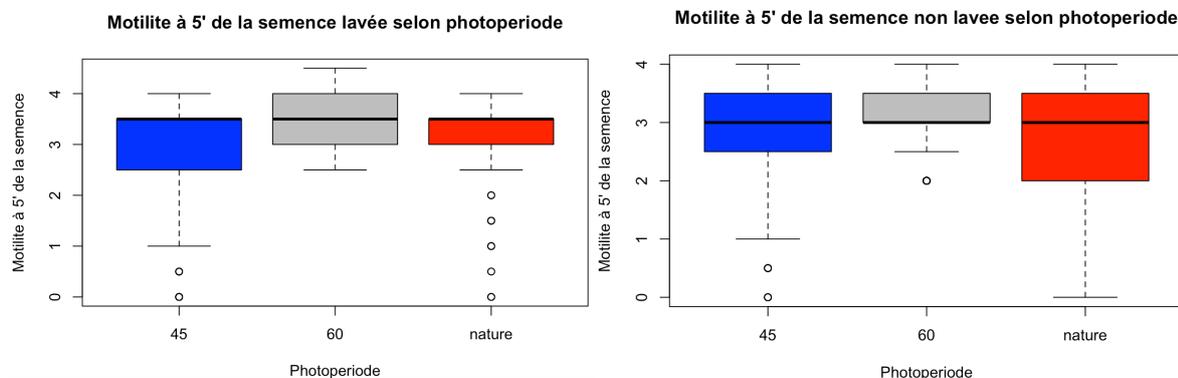


Figure 20 : Motilité à 5 min de la semence lavée et non lavée selon la photopériode

Après 60 minutes, les valeurs de motilité ne sont plus égales entre TP et la répartition des données est plus dispersée.

Pour la semence lavée et la semence non lavée, la mob 60 est toujours la plus élevée pour les boucs 60 et la plus faible pour les boucs sous lumière naturelle.

Les écarts entre les lots de boucs sont compris entre 45% et 75% en semence lavée et entre 0% et 23% en semence non lavée.

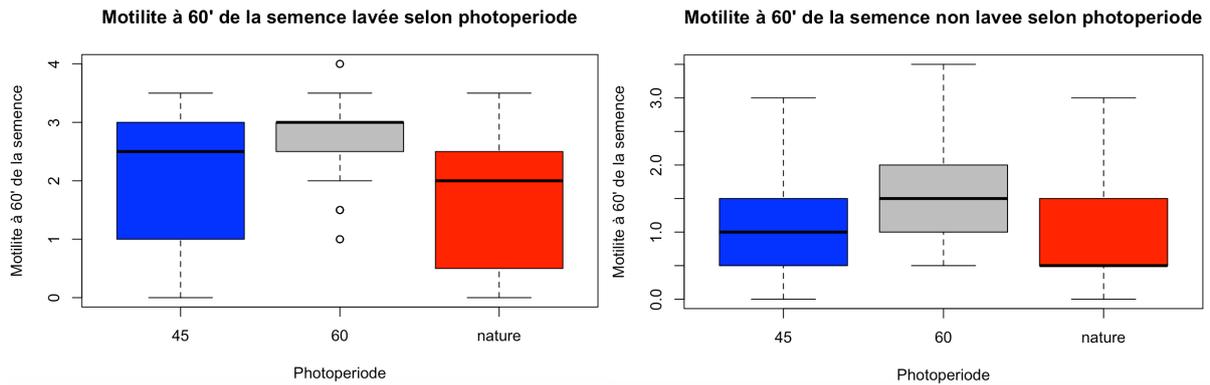


Figure 21 : Mobilité à 60 min de la semence lavée et non lavée selon la photopériode

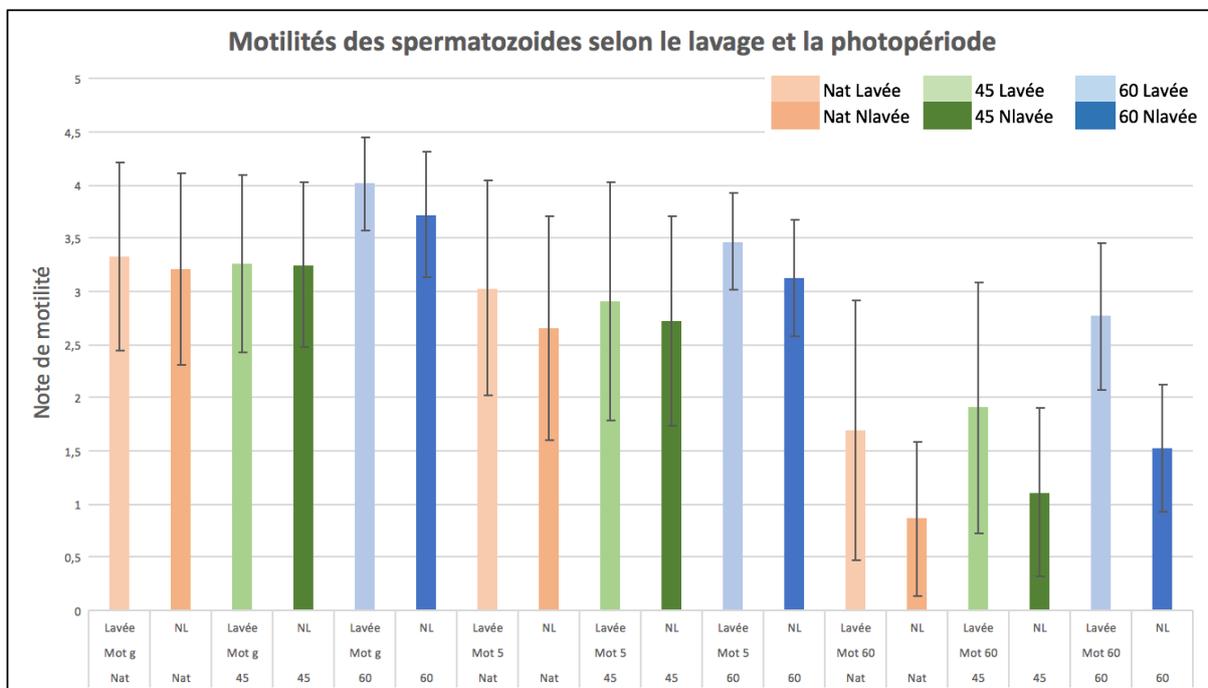


Figure 22 : Motilités des spermatozoïdes selon le lavage et la photopériode

Les tests statistiques montrent que la photopériode a un effet significatif sur la motilité avant glycérolisation ($p\text{-value} = 10^{-9}$). Il existe des différences significatives entre les boucs soumis à une photopériode 60JL/60JC et les deux autres groupes (45JL/45JC et lumière naturelle). Les boucs sous 60JL/60JC auraient une motilité avant glycérolisation supérieure, ce qui corrobore notre analyse descriptive.

Il existe également un effet significatif de la photopériode « lumière naturelle » sur la motilité à 60 min. Il semblerait que les spermatozoïdes des boucs soumis à la lumière naturelle soient moins motiles, ce qui semble surprenant puisque les éjaculats traités venaient de pleine saison sexuelle (septembre à décembre).

III.A.4.3. Nombre de spermatozoïdes dans la semence

Il semblerait que sur un cycle complet, la nombre de spermatozoïdes par éjaculat est plus élevé chez les boucs 45 ($7,5 \cdot 10^6$ spz/ml), puis chez les boucs sous lumière naturelle ($6 \cdot 10^6$ spz/ml), et enfin la valeur la plus basse concerne les boucs 60 ($5 \cdot 10^6$ spz/ml).

Nb de spermatozoïdes dans la semence non lavée selon photoperiode

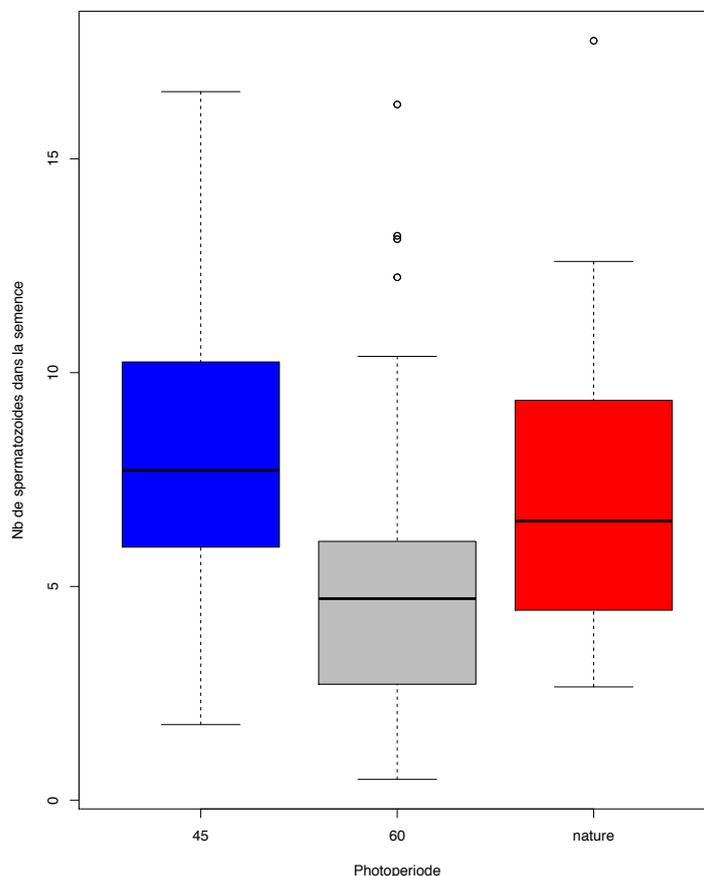


Figure 23 : Nombre de spermatozoïdes dans la semence non lavée selon la photopériode

De plus, le nombre de spermatozoïdes produit par éjaculat diffère en fonction de la saison sous photopériode naturelle et les variations du nombre de spermatozoïdes sont amoindries sous conditionnement lumineux. Ces résultats vont de pair avec une étude antérieure (Delgadillo, 1990) dans laquelle ils ont montré que sous alternance 30JL/30JC et sous alternance 60JL/60JC, il existait une augmentation puis un maintien du nombre de spermatozoïdes à un niveau relativement élevé. Les rythmes photopériodiques artificiels peuvent ainsi diminuer ces variations.

Les tests statistiques montrent qu'en semence non lavée, l'effet de la photopériode est significatif sur le nombre de spermatozoïdes ($p\text{-value}=10^{-16}$), ce qui confirme notre analyse descriptive. Le nombre de spermatozoïdes est significativement plus élevé chez les boucs 45 que chez les boucs 60 et sous lumière naturelle.

Ce résultat est surprenant puisque la testostérone stimule la spermatogénèse. Or nous avons vu qu'il n'y avait pas de différence significative du TTP parmi nos boucs.

III.A.4.4. Volume et concentration de la semence

Sur un cycle complet, il semblerait que le volume et la concentration de la semence soient plus élevés chez les boucs 45 que chez les deux autres lots. Il ne semble pas y avoir de différence de concentration entre boucs 60 et boucs sous lumière naturelle. Cependant, le volume de la semence est bien plus faible pour les boucs 60 que pour les boucs 45 et sous lumière naturelle.

Enfin, la variabilité des valeurs semble quasi identique quel que soit le rythme photopériodique.

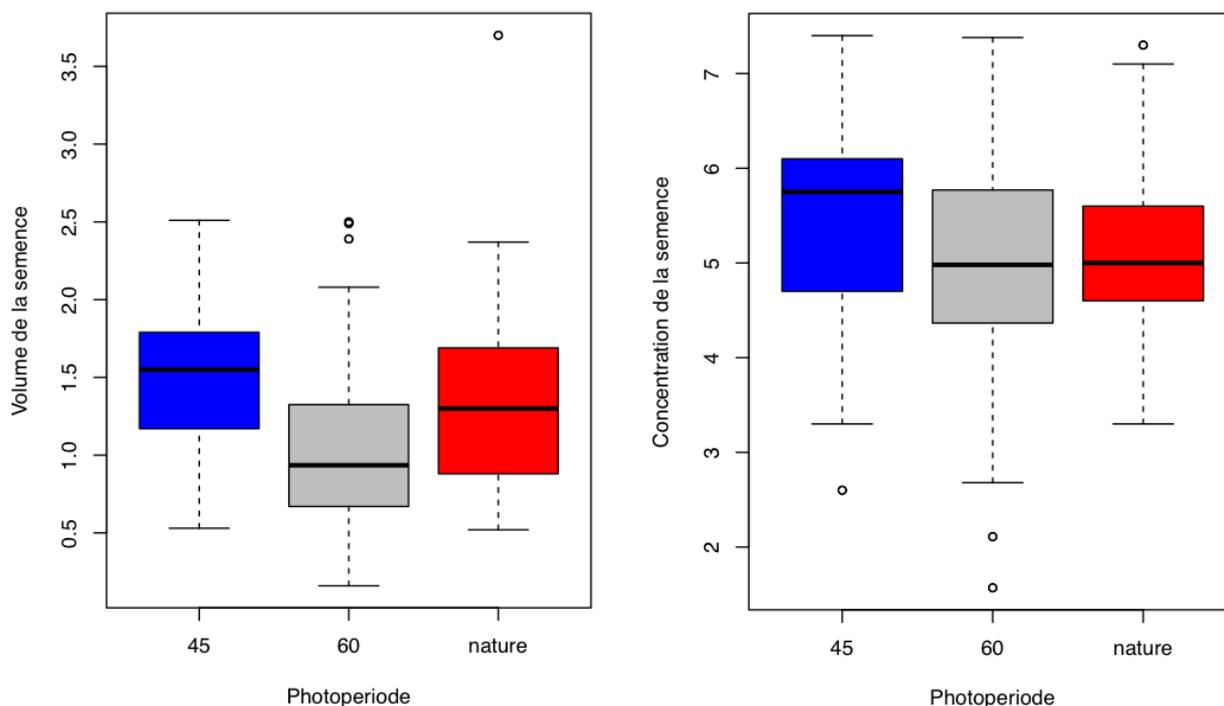


Figure 24 : Volume et concentration de la semence selon la photopériode

Pour le volume et la concentration de la semence, l'effet de la photopériode est significatif et il existe des différences significatives ($p\text{-value}=10^{-16}$) de volume/concentration entre les boucs soumis aux trois photopériodes.

L'analyse statistique suggère que le volume et la concentration sont plus élevés chez les boucs 45 que chez les boucs 60 et sous lumière naturelle.

III.A.4.5. Rendement de congélation

Le rendement de congélation correspond au rapport « nombre d'éjaculats conservés / nombre d'éjaculats congelés ». Ainsi, ce rapport vaut 1 lorsque l'éjaculat est conservé suite au contrôle qualité (c'est-à-dire si sa mob5 est supérieure ou égale à 30% et sa mot5 est supérieure ou égale à 3), et vaut 0 lorsqu'il est jeté.

L'analyse descriptive montre que le rendement de congélation moyen est toujours supérieur en semence lavée qu'en semence non lavée. Cependant, l'écart de rendement de congélation semble plus faible pour les boucs 45 entre semence lavée et semence non lavée. De plus, avec ou sans lavage, le rendement de congélation semble toujours meilleur sous la photopériode 60JL/60JC.

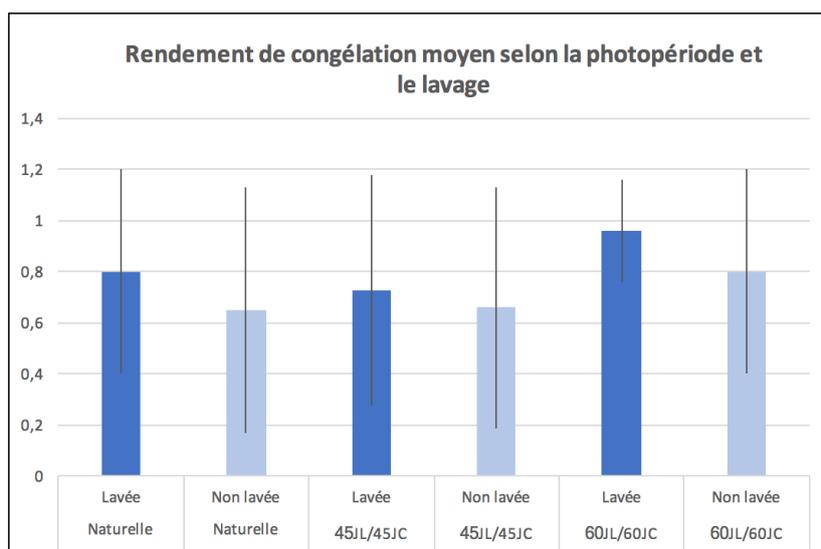


Figure 25 : Rendement de congélation selon la photopériode et le lavage

L'analyse statistique montre que l'effet du lavage et de la photopériode est significatif sur le rendement de congélation. Les boucs 60 ont un rendement de congélation significativement différent par rapport aux boucs 45 et aux boucs sous lumière naturelle. Ceci est certainement en lien avec l'âge des boucs puisque les boucs 45 et les boucs naturels, plus âgés, étaient au CIA de Rouillé.

Afin de pallier la différence entre les boucs de Capgènes et les boucs de Rouillé et ainsi ne plus tenir compte des écarts de rendement intrinsèquement liés à leur âge, un écart relatif entre rendements de congélation en semence lavée et en semence non lavée a été fait.

Les résultats montrent que l'écart relatif est plus faible pour les boucs 45, et similaire chez les boucs 60 et sous lumière naturelle. Ceci suggère soit que les spermatozoïdes survivent mieux au lavage chez les boucs 45, soit que la composition du plasma séminal chez les boucs 45 présente des écarts moins importants avant et après lavage que les deux autres lots.

Rendement de congélation	Photopériode 45/45	Photopériode 60/60	Photopériode naturelle
Semence lavée	73%	96%	80%
Semence non lavée	66%	80%	65%
% écart de rdt de congélation L / NL	-9,5%	-16,6%	-15%

Figure 26 : Ecart relatif des rendements de congélation en fonction du lavage et de la photopériode

III.B. Résultats de l'expérience 2

III.B.1. Caractérisation de l'éclairage blanc classique utilisé au CIA

Nous avons réalisé une acquisition de spectre de rayonnement lumineux émis par un tube fluorescent blanc classique à la hauteur des yeux des animaux à l'aide d'un spectroradiomètre. La figure 24 décrit le spectre ainsi obtenu. La forme du spectre est conforme à celle d'un tube fluorescent avec trois principaux domaines de longueur d'ondes visibles :

- Une bande spectrale entre les longueurs d'onde 480 et 500 nm (bleue)
- Une bande spectrale entre les longueurs d'onde 520 et 580 nm (vert-jaune)
- Une bande spectrale à deux pics entre les longueurs d'onde 580 et 640 nm (rouge)

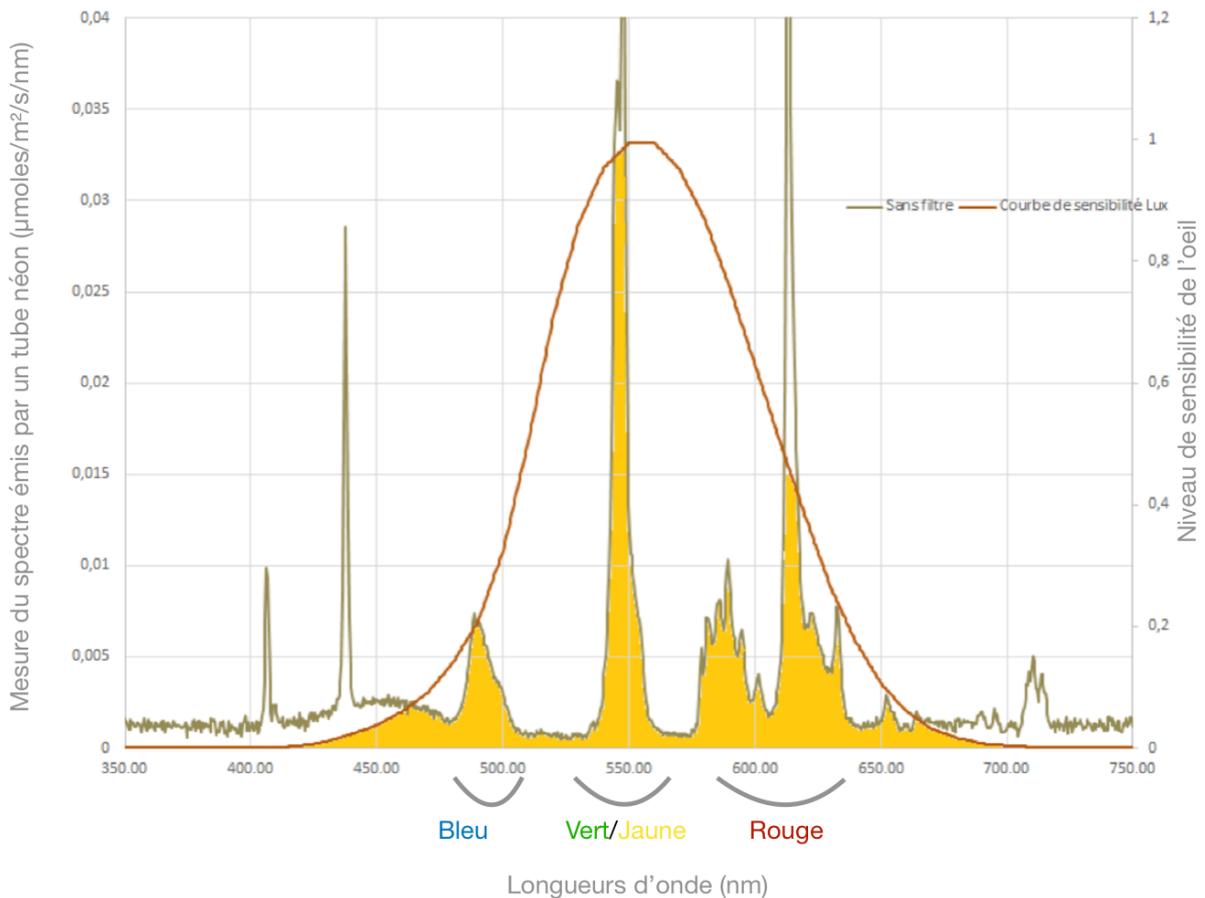


Figure 27 : mesure du spectre émis par un tube fluorescent (—) et évaluation du nombre de lux émis (aire sous la courbe d'émission limitée au champ de la sensibilité de l'œil humain (—))

L'aire sous la courbe représente le nombre de lux émis, soit le flux lumineux reçu par unité de surface dans le domaine visible. Ces données nous serviront de base pour l'élaboration des conditions d'éclairage expérimental : en découpant le spectre par domaine de longueurs d'onde, nous allons pouvoir extrapoler les valeurs d'intensité à fournir aux animaux dans les domaines bleu et rouge que nous voulons étudier.

Eclairage en Lux :340-750nm	Sans filtre	Rouge	Bleu
- Mesures en conditions réelles au CIA	426	105	14
- Valeurs normalisées pour un éclairage source blanc de 200lux	200	49,3	6,4
- Valeurs normalisées pour un éclairage source blanc de 70lux	70	17,3	2,2
- Valeurs normalisées pour un éclairage source blanc de 10lux	10	2,5	0,3

Figure 28 : Acquisition de l'intensité de flux émise par un tube fluorescent (totale et par domaine de couleur) et calcul des intensités de flux à fournir par domaine de couleur pour l'éclairage expérimental équivalent à une source blanche de 200 lux, 70 lux ou 10 lux.

III.B.2. Spectres de rayonnement lumineux obtenus avec les tubes fluorescents blancs, bleus et rouges prévus pour l'exposition des animaux

Nous avons réalisé des acquisitions de spectre de rayonnement lumineux émis par les tubes fluorescents bleus et rouges prévus pour réaliser l'éclairage expérimental. A partir de ces spectres, pour chaque modèle de tube fluorescent, nous avons pu déterminer les niveaux d'éclairage lumineux pour les différents domaines de longueur d'ondes.

Couleur des Tubes fluorescents	BLANC	BLEU	ROUGE
Energie 300-1100 nm (W/m ²)	6,273	3,4704	0,3986
Eclairage en Lux :340-750nm	618,232	181,1326	10,6546
Flux de photons 400-700 nm (µmoles/m ² /s)	8,7435	7,9343	0,7346
UVA-BLEU : 350-500 nm (µmoles/m ² /s)	2,4059	6,9698	0,0538
BLEU élargi 400-500 nm (µmoles/m ² /s)	2,0562	6,8489	0,0336
BLEU strict 445-455 nm (µmoles/m ² /s)	0,1763	1,1373	0,0038
VERT 500-600 nm (µmoles/m ² /s)	3,3371	0,8495	0,0205
ROUGE CLAIR 600-700 nm (µmoles/m ² /s)	3,347	0,2345	0,6803
ROUGE SOMBRE 700-800 nm (µmoles/m ² /s)	1,8362	0,527	0,1172
RC/RS	1,8227	0,445	5,802
RC 655-665 nm (µmoles/m ² /s)	0,145	0,0236	0,2455
RS 725-735 nm (µmoles/m ² /s)	0,1399	0,0439	0,0101

Figure 29 : Acquisition de données par spectroradiométrie dans les conditions expérimentales (1 ou 2 tubes fluorescents allumés / luminaire de couleur blanche/bleue/rouge)

Dans la mesure où il n'existe pas de références bibliographiques sur l'effet de chaque domaine de longueurs d'onde donné sur les caprins et leur sécrétion de mélatonine, nous ne pouvons pas prendre le risque de laisser passer le moindre photon en dehors de la gamme

de longueurs d'onde visée (soit 450 +/- 25nm pour le bleu et 620 +/- 10nm pour le rouge). Les résultats présentent plusieurs problèmes par rapport à l'exposition expérimentale prévue :

- L'émission des tubes fluorescents bleus est parasitée par des flux de vert et de rouge
- L'émission des tubes fluorescents rouges est parasitée par de faibles flux bleus et verts
- Les tubes fluorescents rouges n'émettent qu'une très faible quantité de lux, il est donc impossible de réaliser les éclairages prévus de 70 et 200 lux avec cet équipement.

De plus, les tubes fluorescents blancs et bleus dépassent tous les deux la limite maximale d'éclairement de notre essai qui est de 200 lux.

Ces résultats ont permis de choisir les filtres adéquats pour l'expérimentation. Nous avons donc utilisé des tubes fluorescents bleus et blancs et ajouté des filtres pour sélectionner les gammes de longueurs d'onde à tester et/ou grader l'intensité des tubes fluorescents.

Domaine de couleur du traitement expérimental	Intensité lumineuse du traitement	Combinaison de tubes fluorescents / filtres nécessaires par bloc d'éclairage
Blanc	200	1 tube (blanc + 1c de Lee216) 1 tube (rouge + 3c de Lee275 + 1c de Lee716)
	70	1 tube (blanc + 1c de Lee216 + 2c de Lee298) 1 tube (rouge + 3c de Lee275 + 1c de Lee716)
	10	1 tube (blanc + 1c de Lee216 + 2c de Lee225 + 1c de Lee275) 1 tube (rouge + 3c de Lee275 + 1c de Lee716)
Bleu	200	1 tube (bleu + 2c de Lee216) 1 tube (rouge + 3c de Lee275 + 1c de Lee716)
	70	1 tube (bleu + 2c de Lee216 + 2c de Lee298) 1 tube (rouge + 3c de Lee275 + 1c de Lee716)
	10	1 tube (bleu + 2c de Lee216 + 2c de Lee225 + 1c de Lee275) 1 tube (rouge + 3c de Lee275 + 1c de Lee716)
Rouge	200	1 tube (blanc + 1c de Lee029) 1 tube (blanc + 1c de Lee029)
	70	1 tube (blanc + 1c de Lee029 + 2c de Lee298) 1 tube (blanc + 1c de Lee029 + 2c de Lee298)
	10	1 tube (blanc + 1c de Lee029 + 2c de Lee225 + 1c de Lee275) 1 tube (blanc + 1c de Lee029 + 2c de Lee225 + 1c de Lee275)

Figure 30 : Tableau des filtres utilisés pour les différents traitements (c : couche)

III.B.3. Spectres de rayonnement lumineux obtenus avec les tubes fluorescents blancs et bleus équipés de filtres

Comme l'intensité des tubes fluorescents blancs et bleus est supérieure à celles testées dans notre essai, l'ajout de filtres pour grader l'intensité n'est pas suffisante. Nous avons donc décidé de n'utiliser qu'un seul tube fluorescent au lieu de deux par boîtier. Or, il n'est pas possible de ne placer qu'un seul tube fluorescent dans le boîtier car le circuit électrique est conçu pour ne fonctionner qu'en présence de deux tubes fluorescents. D'après les mesures effectuées, les tubes fluorescents rouges sont ceux qui émettent la plus faible intensité. Nous avons donc décidé de faire des couples de tubes fluorescents « bleu/rouge » et « blanc/rouge » en ajoutant des filtres opaques noirs sur les tubes fluorescents rouges afin

d'empêcher toute émission de lumière rouge. Cependant, après quelques tests, nous avons constaté que les tubes fluorescents « opacifiés » laissaient passer de la lumière rouge. Nous avons donc ajouté une couche d'un filtre « coupe-rouge » pour avoir un tube fluorescent totalement opaque. Les résultats ont été concluants.

Une dernière batterie de tests a pu être réalisée avec les combinaisons de tubes et de filtres préconisés et donne les résultats suivants :

- L'éclairage Bleu 70 présente une part de flux de photons non négligeable dans le domaine du VERT,
- L'éclairage Blanc 70 présente une intensité lumineuse de 80 lux au lieu de 70 lux mais les proportions de Rouge/Vert/Bleu sont respectées,
- L'éclairage Blanc 200 présente une intensité lumineuse de 236 lux au lieu de 200 lux mais les proportions de Rouge/Vert/Bleu sont respectées.
- L'éclairage Rouge 200 présente une intensité est encore trop faible par rapport à la valeur cible (25,8 lux mesurés vs 49,3 lux attendus).
- L'éclairage Rouge 70 présente une intensité trop faible par rapport à la valeur cible (6,7 lux mesurés vs 17,3 lux attendus)

La mise au point des éclairages expérimentaux se poursuit actuellement. La mise en œuvre pratique de l'expérimentation sur les boucs est, quant à elle, soumise à l'obtention de l'autorisation de projet par le comité d'éthique et le ministère de l'enseignement supérieur, de la recherche et de l'innovation. C'est pourquoi l'ensemble des résultats n'est pas disponible à ce jour.

IV. DISCUSSION - PERSPECTIVES

IV.A. Expérience 1

IV.A.1. Les traitements lumineux

Nous avons émis l'hypothèse que si les traitements photopériodiques pouvaient abaisser le TTP, l'activité lipase serait également réduite. Or, l'effet des traitements photopériodiques n'est pas significatif sur le taux de testostérone plasmatique mais est significatif sur l'activité lipase. Le passage d'une alternance de 60JL/60JC à une alternance 45JL/45JC réduit donc l'activité lipase. Si l'activité lipase est réduite, son effet délétère devrait être amoindri sur les spermatozoïdes non lavés et nous devrions observer une motilité/mobilité supérieure pour les boucs 45.

Pour autant, même avec une activité lipase très élevée, les boucs 60 présentent une motilité avant glycérolisation supérieure aux deux autres lots et une mobilité supérieure à 5 et 60 minutes après décongélation, ce qui ne va pas dans le sens de nos résultats sur l'activité lipase.

De plus, le nombre de spermatozoïdes est significativement plus élevé chez les boucs 45, la production spermatique est donc plus stimulée sous une alternance 45JL/45JC. Cela ne signifie pas pour autant que les spermatozoïdes sont de meilleure qualité. Le volume et la concentration de la semence sont également plus élevés chez les boucs 45, ce qui corrobore l'idée d'une stimulation de la production spermatique.

Le rendement de congélation est plus élevé chez les boucs 60, c'est-à-dire qu'il y a plus de paillettes conservées après congélation que chez les deux autres lots. La qualité de la semence semble donc être plus résistante à la congélation. Cependant, le lavage n'apporte pas une grande différence de rendement de congélation pour les boucs 45, pas plus que sur la mobilité et la motilité avant glycérolisation. On peut émettre l'hypothèse que la composition de la semence avant lavage n'est pas très différente que celle de la semence après lavage.

Les résultats de cette étude ne nous permettent pas de conclure que le rythme 45JL/45JC permettrait de supprimer l'étape de lavage dans le traitement de la semence et d'obtenir un meilleur rendement de production de semence congelée. Cependant, cette étude permet de montrer que sous une alternance 45JL/45JC, l'activité lipase est nettement réduite.

Les résultats ne permettent pas non plus de conclure qu'un traitement photopériodique est réellement meilleur qu'un autre, les résultats présentent des avantages et des inconvénients pour les deux rythmes artificiels.

D'autres études comparatives ont démontré la supériorité du traitement 60JL/60JC en termes de production de semence (Martin, 2002 ; Furstoss, 2003) par rapport au traitement 45JL/45JC. Cependant, ces études ne s'intéressaient pas à la concentration en lipase ou à la possibilité de ne pas laver la semence.

En 2008 et 2011, de la semence lavée et non lavée produite sous régime lumineux 45JL/45JC à Rouillé a été mise en fertilité dans le réseau expérimental de l'équipe FERTICAP, démontrant que la fertilité de la semence non lavée était aussi bonne que celle de la semence lavée. En 2012, Capgènes a passé une partie de ses effectifs en 45JL/45JC pour produire de la semence Lavée/Non Lavée. La modalité de préparation de la semence n'a pas eu d'impact sur la fertilité à l'insémination quelle que soit la race. Les doses produites en lavée et en non lavée ne présentaient pas de différence de fertilité par rapport aux doses témoins contemporaines hors protocole.

Malgré une absence de différence au niveau de la fertilité en élevage, l'utilisation du protocole non lavée à Capgènes n'est pas encore envisageable en routine. En effet, le traitement photopériodique 45JL/45JC semble induire une reprise plus lente de la production des mâles en première année, accompagnée d'un rendement technologique inférieur

pendant les premiers mois de traitement pour les deux races. L'adaptation au traitement lumineux paraît moins rapide qu'avec l'alternance 60JL/60JC. Le non lavage de la semence permet de produire plus de doses mais les éliminations (survie des spermatozoïdes après décongélation) sont nettement plus importantes qu'en lavée, ce qui se traduit par un rendement technologique inférieur de 20% chez les deux races. Ce dernier ne permet plus d'atteindre la productivité (en doses par mâle) nécessaire aux besoins du programme de sélection et ce avec un coût de production de semence qui augmente proportionnellement à la baisse du rendement technologique observé.

La suppression de l'étape de lavage de la semence au niveau du centre de production permettrait pourtant un gain de temps (environ 0.20 ETP), une économie de consommable (-20 %), un gain en nombre de spermatozoïdes dilués (+ 15%) et un gain en rendement technologique (+5 à +7%).

IV.A.2. Les autres alternatives au lavage

Des résultats antérieurs suggèrent que la qualité de la semence est altérée en présence de plasma séminal, malgré une inhibition efficace de l'activité lipase. Il doit donc y avoir un autre facteur, indépendant de l'activité lipase qui a un effet délétère sur la semence. La glycoprotéine BUSgp60 possédant également une activité phospholipase A, il n'est pas exclu que celle-ci agisse directement sur les phospholipides membranaires des spermatozoïdes et soit responsable de l'effet néfaste sur la semence. Cependant, pour le moment, aucune étude n'a été conduite dans ce sens. Il faudrait donc explorer un effet phospholipase direct de BUSgp60 sur la membrane des spermatozoïdes dans un milieu exempt de tout substrat lipidique (triglycérides du lait).

On pourrait également envisager l'utilisation pour capter les AGL de cholestérol-loaded-cyclodextrines (CLC) qui n'arracheraient pas le cholestérol membranaire contrairement aux β -cyclodextrines qui ont eu un effet délétère. Les CLC, utilisées sur la semence bovine pour ajouter du cholestérol aux membranes plasmiques des spermatozoïdes, ont un effet très positif sur la survie à la congélation (Purdy Graham, 2004a et 2004b). La restauration du cholestérol membranaire par des cholestérol-méthyl- β cd (après déplétion par β cd) est évoquée également par Klein *et al.* (1995). Cependant, si elles sont saturées en cholestérols, il n'est pas évident qu'elles captent correctement les AG du milieu.

IV.B. Expérience 2

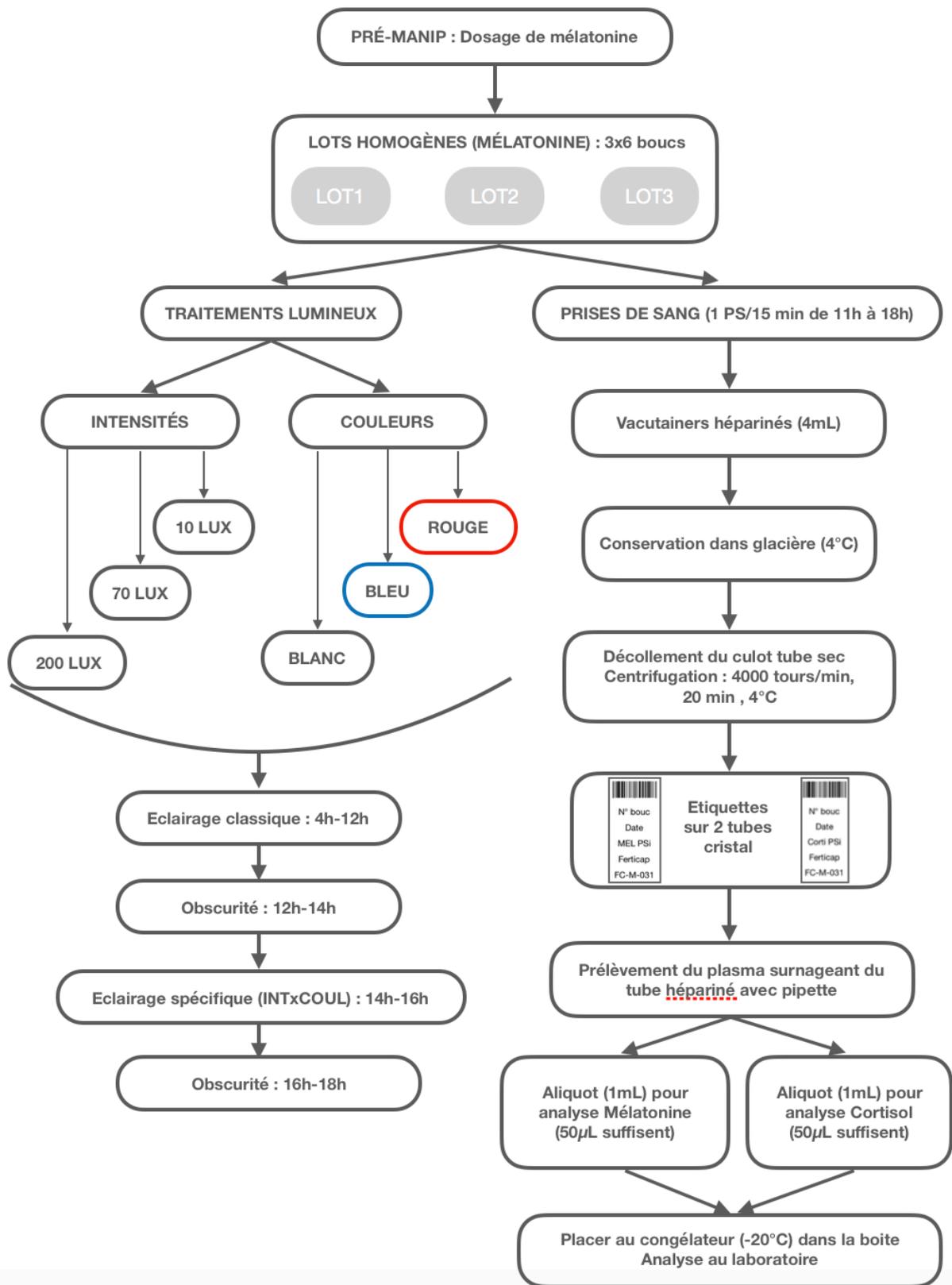
Si la première étape de ce projet (dont le protocole a été présenté dans le présent rapport) peut être conduite et que nous arrivons à déterminer l'intensité et la bande spectrale utile au contrôle de la sécrétion de mélatonine, il est envisagé d'observer la réponse physiologique de chèvres et de boucs à un traitement photopériodique conduit avec la source/intensité la plus prometteuse définie à l'étape précédente et de la comparer celle obtenue avec une installation classique « tubes fluorescents 200lux ».

- Les boucs seraient soumis à une alternance continue de 60 jours longs / 60 jours courts. Leur activité sexuelle serait suivie pendant 2 cycles complets (testostéronémie hebdomadaire + mesures de comportement à la collecte / qualité et quantité de semence). Le suivi serait réalisé dans le CIA de l'UE FERLus.

- Les chèvres recevraient un traitement photopériodique de 90 jours longs (démarrage début décembre lorsque les chèvres sont cycliques) suivis de jours courts pendant environ 6 mois (temps nécessaire pour mesurer la durée de la période d'activité sexuelle induite) et leur cyclicité serait suivie pendant toute la durée du traitement (progestéronémie hebdomadaire). La cyclicité sera comparée à celle d'un témoin négatif (éclairage à tubes fluorescent 200 lux mimant la photopériode naturelle) et d'un témoin positif (traitement photopériodique avec éclairage à tubes fluorescents 200 lux), de façon à évaluer la capacité du nouveau traitement à inhiber la cyclicité des chèvres lors de la phase de jours longs, puis à la stimuler pendant les jours courts. Ce suivi serait réalisé au bâtiment conditionné de Nouzilly.

Attention, l'unité de mesure de l'éclairement lumineux « lux » correspond au flux lumineux reçu par une unité de surface dans le domaine visible *pour l'œil humain*. Les caprins n'ayant pas exactement la même vision que l'homme, cela crée une approximation dans la façon de mesurer le flux lumineux qui leur est nécessaire.

ANNEXE : Fiche opératoire du protocole de l'expérience 2



BIBLIOGRAPHIE

- 1) Combes, D., Robert, P., Hurlus, J. (2015). Lumière : efficacité et architecture des plantes ; impact des édifices / des éclairages sur le développement des plantes. L'exemple des pelouses. *Innovations Agronomiques*, 45, 13-22.
- 2) Dardente H., Lomet D., Robert V., Decourt C., Beltramo M., Pellicer Rubio M. 2016. Seasonal breeding in mammals: from basic science to applications and back. *Theriogenology* 86 (1), 324-332.
- 3) Dardente, H., Freret, S., Fatet, A., Collet, A., Chesneau, D., Pellicer-Rubio, M. (2012). Melatonin-dependent timing of seasonal reproduction: molecular basis and practical applications. In: 63rd Annual Meeting of the European Federation of Animal Science (p. 178). EAAP Book Abstracts, 18. Presented at 63. Annual Meeting of the European Federation of Animal Science, Bratislava, Slovaquie (2012-08-27 - 2012-08-31). Wageningen, Pays Bas: Wageningen Academic Publishers.
- 4) Deverson, S. L., J. Arendt, et I. A. Forsyth. Sensitivity of Goats to a Light Pulse during the Night as Assessed by Suppression of Melatonin Concentrations in the Plasma. *Journal of Pineal Research* 8, n°2 (1990): 169-77
- 5) Fatet, A., Tuauden, M. (2013). Reproduction des chèvres en toute saison : FLOCK-REPROD une solution durable. Paris, FRA : Edition INRA, 22 p.
- 6) Furstoss V., Essai photopériodique CAPRIA résultats, 2003
- 7) Guesdon V., Malpaux B., Delagrangé P., Spedding M., Cornilleau F., Chesneau., Haller., Chaillou E. (2013). Rapid effects of melatonin on hormonal and behavioral stressful responses in ewes. *Psychoneuroendocrinology* 38, 1426—1434.
- 8) Jacobs G., Deegan J., Neitz J. (1998). Photopigment basis for dichromatic color vision in cows, goats, and sheep. *Visual Neuroscience*, 15(3), 581-584.
- 9) Martin P, Effets d'un traitement photopériodique sur les caractéristiques spermatiques de boucs issus de prétestage, 2002
- 10) Nunes J.F., Corteel J.-M., Combarous Y., Baril G., Leboeuf B., Rôle du plasma séminal dans la survie in vitro des spermatozoïdes de bouc. *Reproduction Nutrition Développement*, 1982, 22 (4), pp.611-620
- 11) Pellicer Rubio M.T., Fatet A., Freret S., Druart X., Chesneau D., Malpaux B. (2012). Application du photopériodisme en élevage pour la maîtrise de la reproduction. In: 43ème Congrès de la Société Francophone de Chronobiologie (p. 43). Presented at 43. Congrès de la Société Francophone de Chronobiologie, Loches, FRA (2012-09-26 - 2012-09-28).
- 12) Pellicer-Rubio M-T., Combarous Y. (1998). Deterioration of goat spermatozoa in skimmed milk-based extenders as result of oelic acid released by the bulbourethral lipase BUSgp60. *Journal of Reproduction and Fertility*, 112,95-105.
- 13) Radlwimmer, F. and Yokoyama, S. (1997). Cloning and expression of the red visual pigment gene of goat (*Capra hircus*). *Gene*, 198(1-2), pp.211-215.
- 14) Ribeiro, A., Silva, M., Rosa, J., Souza, S., Teixeira, I. and Laus J. (2009). Ultrasonographic and echobiometric findings in the eyes of Saanen goats of different ages. *Veterinary Ophthalmology*, 12(5), pp.313-317.
- 15) Sias B., Ferrato F., Pellicer-Rubio M.T., Forgerit Y., Guillouet P., Leboeuf B., Carrière F.,(2005). Cloning and seasonal secretion of the pancreatic lipase-related protein 2 present in goat seminal plasma. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*. 1686. 169-80. 10.1016/j.bbalip.2004.09.008.
- 16) Schmidt C., Xhrouet M., Hamacher M., Delloye E., LeGoff C., Cavalier E., Collette F., Vandewalle G. Light exposure via a head-mounted device suppresses melatonin and improves vigilant attention without affecting cortisol and comfort. *PsyCh Journal* (2018)
- 17) Zarazaga L.A., Celi I., Guzman J.L., Malpaux B., Melatonin concentrations in the two jugular veins and relationship with the seasonal reproductive activity in goats. *ScienceDirect, Theriogenology* 74 (2010) 221-228

SUMMARY

Goats have a seasonal reproduction. Variations in melatonin secretion, in response to seasonal changes in day length, regulate goats' sexual activity and rest. Quality and quantity of semen produced by bucks held in insemination centers depend on the photoperiodic treatment they receive. During semen processing for the production of AI doses, the seminal plasma has to be washed off because of the presence of a Cowper glands-secreted lipase BUSgp60 which is deleterious to sperm preservation. This washing step costs time and money (consumables, production yield...), an alternative was studied in experiment 1. Testosterone is under photoperiodic control and sexual glands secretions are testosterone-dependent, so we explored the possibility of using photoperiodic treatment as a modulator of BUSgp60 secretion. Quality of washed or unwashed semen, testosterone and lipase activity were monitored on three groups of bucks: group A was exposed to 45LD / 45SD, group B was exposed to 60LD/60SD and control group received natural light. Lipase activity was significantly reduced in the semen of A bucks and there were little variations in freezing yield between washed and unwashed semen. Still, results do not support the conclusion that 45LD/45SD could allow eliminating washing or ensure a better production yield. While it is possible to manage semen production in bucks with adequate lighting conditions, precise lighting requirements have never been studied. Experiment 2 aims at determining the wavelength domain and light intensity that are useful to melatonin secretion. Field work with animals being postponed, preliminary spectral acquisitions allowed defining precise experimental lighting conditions providing the needed intensities (200, 70 and 10 lux) and wavelength domains (de 450 +/- 25nm et 620 +/- 10nm).