

Evolution des techniques de préparation de la semence et d'insémination artificielle chez les bovins

GERARD O. (1), PONSART C. (1), PETIT M. (2), HUMBLLOT P. (1)

(1) UNCEIA - département R et D - 13 rue Jouët - 94704 Maisons-Alfort ; UNCEIA - département fédéral - 149 rue de Bercy - 75595 Paris Cedex 12

RESUME - L'insémination artificielle bovine représente en France la plus ancienne et la plus répandue des biotechnologies de la reproduction. Elle s'est développée au début des années 1950, d'abord avec de la semence réfrigérée mais a connu son plein essor dans les années 1960 grâce à l'avènement des techniques de congélation d'abord en pellets ou en ampoules puis en paillettes qui ont permis le stockage à long terme des semences et donc le développement des programmes de sélection. Elle apporte des garanties aux éleveurs en termes de qualité biologique et bactériologique de la semence, d'innocuité sanitaire des doses utilisées et de progrès génétique apporté par les reproducteurs issus des schémas de sélection. Sa réussite repose sur la maîtrise des techniques de préparation de la semence comprenant l'environnement à la collecte et le traitement de la semence, sur la technicité des éleveurs notamment pour la détection des chaleurs et sur la qualité et la rigueur de la mise en place. Le présent article se propose de retracer les pratiques et les évolutions observées dans l'amélioration des techniques en vigueur que celles-ci soient le fruit de perfectionnements progressifs tels que le code à barres sur les paillettes ou de technologies de rupture telles que le sexage de la semence ou la génomique.

Technical practices and evolution of semen processing and artificial insemination in cattle.

GERARD O. (1), PONSART C. (1), PETIT M. (2), HUMBLLOT P. (1)

UNCEIA - département R et D - 13 rue Jouët - 94704 Maisons-Alfort

SUMMARY - Artificial insemination in cattle is today the oldest and most widespread reproductive biotechnology in France. It started at the beginning of the nineteen-fifties thanks to liquid semen technology but really increased during the nineteen-sixties following the implementation of freezing/thawing processes first in ampoules and pellets and then in straws. This allowed the long-term storage of semen and thus the development of genetic schemes. It provides the breeders various guarantees such as the bacteriological and biological quality of semen, its sanitary reliability and the genetic merit of proven sires. To be successful, it requires highly mastered methods of semen processing from sperm collection to the storage of straws, a good ability of the breeders to detect females in heat and professionally trained inseminators. This article aims at describing current practices and evolutions observed during the last fifty years to improve the different methods and technologies leading to a successful insemination. It considers both progressive improvements such as the printing of barcodes on straws or gap technologies such as semen sexing and genomics.

INTRODUCTION

L'insémination artificielle (IA) dans l'espèce bovine a connu son essor en France au début des années 1950. Aujourd'hui, quatre millions de femelles sont inséminées chaque année sur un cheptel de huit millions de vaches. Première biotechnologie de la reproduction, elle a d'abord été proposée avec de la semence fraîche, et a bénéficié de l'extraordinaire résistance des spermatozoïdes bovins aux divers traitements ainsi que de l'énorme potentiel de dilution permettant la diffusion accrue des gènes des individus les plus recherchés. L'avènement des techniques de congélation, d'abord en pellets (Nagase et Niwa, 1964) puis en paillettes (Cassou, 1968) a permis le développement des programmes de sélection et la constitution de stocks de semence importants. Adossée à un dispositif sanitaire rigoureux, elle offre à l'éleveur les meilleures garanties de diffusion du progrès génétique sans risque de contamination de son troupeau. Cependant pour être réellement efficace sur un plan zootechnique, elle doit assurer la conjonction de trois facteurs essentiels : une semence de qualité biologique irréprochable, une conduite d'élevage bien maîtrisée et le respect des règles fondamentales de la mise en place.

Certains aspects relatifs aux pratiques de production et de mise en place de la semence ont fait l'objet d'évolutions importantes. En outre, avec la diminution des performances de reproduction observée dans les races laitières, la question d'un éventuel effet mâle peut être posée, en plus des effets génétiques et des conditions d'élevage (Barbat *et al.*, 2005, Ponsart *et al.*, 2008). Dans cette synthèse, les principales évolutions observées dans le cadre de la production de semence, ainsi que les pratiques actuelles associées à l'IA sont décrites.

1. EVOLUTION DES MODES ET PRATIQUES DE PRODUCTION DE SEMENCE

Dejarnette *et al.* (2004) ont rapporté des valeurs comparables pour plusieurs critères de qualité (volume de sperme de 4,6 à 6,5 ml, motilité ≥ 70 %, intégrité acrosomique = 75 à 80 %) et la circonférence scrotale ont été observées entre un groupe de taureaux « actuels » (qualité de la semence chez 645 taureaux en production intensive de 2001 à 2003, circonférence scrotale de 2867 taureaux de 1998 à 2002) et des taureaux « historiques » (données publiées entre 1969 et 1977). Avec les avancées technologiques récentes, la caractérisation des éjaculats est facilitée, ce qui contribue aussi à améliorer la qualité de la semence (Dejarnette *et al.*, 2004). Les taux élevés de fécondation *in vivo* (compris entre 79 et 83 %) observés après utilisation de semence congelée vont dans le même sens (Saacke *et al.*, 1998, Sartori *et al.*, 2002, cités par Dejarnette *et al.*, 2004).

1.1. CONTROLE DE FONCTION SEXUELLE (CFS)

Le CFS a pour objectif l'évaluation de l'aptitude des futurs reproducteurs à produire une semence de qualité à la fois fertile et congelable. Si dans les années 1970, ce contrôle répondait à un protocole précis de quinze semaines consécutives de collecte à raison d'une collecte hebdomadaire de deux éjaculats successifs (Thibier et Colchen-Bourlaud, 1972), aujourd'hui les entreprises de sélection (ES) ont sensiblement réduit la durée du CFS. Il correspond à la période nécessaire au jeune taureau pour produire son stock de doses de testage variable selon les entreprises (600 à 900 doses en races laitières). Afin de réduire l'intervalle de

génération et d'accélérer le progrès génétique, les ES ont tendance à prélever les taureaux le plus tôt possible après la puberté dont l'âge varie selon les individus en fonction de facteurs génétiques (Humblot et Ducrocq, 1996) mais aussi environnementaux et alimentaires (Gérard, 1996, Enjalbert, 1998). Barth *et al.* (2008) ont observé que l'alimentation du veau influence l'âge de la puberté et la circonférence scrotale, associés à la première augmentation de la sécrétion de gonadotropines, entre huit et seize semaines d'âge. Le CFS doit donc se faire en station d'élevage en milieu contrôlé. Si l'évaluation précoce permet le testage de taureaux plus jeunes et l'utilisation plus rapide des taureaux élites comme reproducteurs (Sourbe *et al.*, 2002), cette pratique peut conduire à éliminer trop rapidement des animaux tardifs, soit environ 30 % des individus. Les critères d'évaluation retenus sont le volume de l'éjaculat, la concentration en spermatozoïdes totaux et vivants pour le sperme frais, le pourcentage de gamètes anormaux et l'aptitude de la semence à supporter la congélation. Le taux d'élimination des jeunes mâles pour inaptitude à la production est d'environ 15 % pour les races laitières.

1.2. ENTRETIEN DES REPRODUCTEURS ET MODALITES DE PRODUCTION

L'entretien des reproducteurs et les stratégies de production varient en fonction des races et des schémas de sélection. La mise en place des quotas laitiers en 1983 a entraîné une baisse d'activité des ES et des entreprises de mise en place (EMP). Cela a conduit à une recherche accrue d'économies conduisant au développement de la pratique du *lay-off*.

1.2.1. Taureaux en *lay-off*

Le *lay-off* correspond à la période d'inactivité sexuelle imposée aux taureaux, après la constitution de leurs stocks de doses de testage et de réserve génétique (2000 à 5000 doses selon les ES), en attendant les résultats du testage. Il concerne surtout les taureaux de races laitières même si de plus en plus d'ES allaitantes y ont recours (Gérard, 2008). Les animaux, âgés de 18 mois à 4,5 ans en moyenne, sont élevés en lots de six à douze individus et reçoivent une alimentation moins riche en concentrés. Ils ne sont pas collectés et nécessitent moins de main d'œuvre. L'intérêt de cette pratique est donc économique, malgré la perte annuelle d'environ 1 % des animaux. Dans ces conditions, le coût de la journée d'entretien atteint 50 % de celle d'un taureau en production. Seuls les taureaux présentant des index précoces de valeur génétique (valeurs provisoires de moindre précision) prometteurs sont remis en production.

1.2.2. Taureaux en production

Les taureaux en production sont hébergés en boxes individuels de surface variable (16 à 30 m²). Le paillage est fréquent et abondant (10 à 12 kg / j / taureau) afin d'assurer le confort et la propreté de l'animal dont dépend la qualité bactériologique de la semence. L'alimentation se compose de foin de prairie naturelle ou de *ray-grass* anglais (10 à 14 kg / j) et de concentré riche en vitamines et minéraux (3 à 5 kg / j). Quelques taurelleries utilisent l'ensilage d'herbe ou de maïs mais une mauvaise conservation peut avoir un effet négatif sur la qualité de la semence. Les contrôles sanitaires ont lieu au minimum une fois par an et plus fréquemment pour les taureaux d'élite et / ou destinés à l'export.

1.3. CONDITIONS DE COLLECTE

La collecte a lieu dans un local dédié, physiquement séparé des autres bâtiments : la salle de monte. Elle doit être spacieuse, lumineuse et aérée, facile à nettoyer et à désinfecter. Elle comporte des montoirs dans lesquels sont bloqués les bouts en

train ainsi que des éléments de sécurité pour le personnel et les animaux. Les taureaux sont préparés et collectés sur des mâles castrés, les femelles étant déconseillées pour des raisons sanitaires et de sécurité. La préparation sexuelle comprend une phase d'attente passive pendant laquelle le taureau se conditionne en sentant le bout en train (réaction de Flehmen), en le léchant, posant la tête sur la croupe et essayant de le chevaucher. Après un temps variable selon les individus arrive la préparation active pendant laquelle le taureau est autorisé à chevaucher mais pas à donner le coup de rein. Cette pratique permet d'augmenter la quantité de semence récoltée et sa qualité. Après un nombre de fausses montes adapté au taureau, la semence est collectée à l'aide d'un vagin artificiel. Les rythmes de collecte varient en fonction des races, des individus et de leur libido, de la demande en semence et de la longévité commerciale des reproducteurs. Ils sont en général plus intensifs dans les races laitières et des rythmes de deux à trois collectes hebdomadaires de un à deux éjaculats sont courants (Gérard et Humblot, 1992).

1.4. EVALUATION DU SPERME ET PREPARATION DE LA SEMENCE

Une fois collecté, le sperme est transmis au laboratoire pour mesurer le volume (lecture directe dans le tube de collecte gradué ou pesée). La concentration en spermatozoïdes est déterminée par spectrophotométrie, le pourcentage de gamètes mobiles et leur motilité par microscopie optique. Certains laboratoires contrôlent aussi le taux d'anomalies morphologiques et d'autres, équipés de CASA (*Computer Assisted Semen Analyser*) mesurent les paramètres de déplacement et de vitesse des spermatozoïdes. Ces mesures *in vitro* ne sont pas corrélées à la fertilité de la semence mesurée *in vivo* après décongélation. Les critères de qualité varient d'un centre de collecte à l'autre, mais les acteurs de la filière ont validé des recommandations communes (« guide qualité » de l'UNCEIA, 1994). Après évaluation, la semence est diluée dans un milieu salin contenant du glycérol (cryoprotecteur), avec ou sans jaune d'œuf. L'ajout d'anti-oxydant (Oxyfree, ND) augmente *in vitro* les paramètres de vélocité des spermatozoïdes et pour certains taureaux améliore la fertilité *in vivo* (Gérard *et al.*, 2006, Grigal *et al.*, 2008). Malgré des variations selon le taureau et la race, l'objectif est d'obtenir au moins 6 millions de spermatozoïdes mobiles après décongélation. Après dilution, la semence est réfrigérée à 4°C et entame la phase d'équilibration qui correspond à la période séparant l'addition de glycérol de la congélation. Sa durée influence la qualité de la semence et sa fertilité (tableau 1). Après équilibration, la semence est conditionnée en paillettes de 0,25 ml puis congelée soit directement dans les vapeurs d'azote, soit à l'aide d'un congélateur programmable.

Tableau 1 : temps d'équilibration et fertilité de la semence congelée.

Equilibration	Effectif	TNR	Référence
0,5 H	449	56,2 (30j)	Blackshaw <i>et al.</i> (1957)
18H	450	63,9	
2H	2256	66,5 (60/90J)	Martig <i>et al.</i> (1966)
18H	2176	71,3	

1.5. TRACABILITE, CONTRÔLES DE QUALITE ET GESTION DES DONNEES

Chaque éjaculat produit fait l'objet d'un contrôle de qualité effectué, sur deux paillettes prises au hasard, après décongélation pendant 30 s dans de l'eau à 37°C. Il porte sur le pourcentage et le nombre de spermatozoïdes vivants et

motiles estimés en microscopie optique ou à l'aide d'un système CASA. Avant d'être libérées, les doses subissent une quarantaine de trente jours destinée à s'assurer que le donneur n'était pas en incubation d'une maladie contagieuse au moment de la collecte. Depuis 2004, des doses de semence sont identifiées par un code à barres de dix caractères, indiquant le taureau donneur, la date de la collecte et le traitement de la semence. Ce système développé par l'UNCEIA permet de tracer la semence de la collecte à la mise en place. Partie intégrante du « système de management de la qualité » (SMQ) en cours de développement dans la filière IA, il fiabilise l'identification des taureaux, facilite la gestion des stocks et diminue les coûts de gestion des bulletins d'IA mal remplis. Il favorise l'optimisation individuelle des taux de dilution de la semence et des essais de terrain sur la fertilité, à grande échelle et en aveugle. Son extension à l'échelle mondiale est en négociation avec divers partenaires européens et nord-américains. Pour cela, trois caractères supplémentaires, permettant d'identifier le centre de collecte dans une base de données mondiales gérée par l'*International Committee for Animal Registration* (ICAR) seront ajoutés. Aujourd'hui, la lecture du code à barres sur les paillettes et la gestion informatisée en temps réel des paramètres de chaque IA fiabilisent les données récoltées et favorisent les suivis de reproduction et les bilans génétiques intra-troupeaux. Assurer un suivi fiable d'une dose de semence depuis la collecte du sperme jusqu'à sa mise en place apporte des garanties sur les plans sanitaire, génétique (gestion des données de l'IA dans l'état civil bovin et le système d'information génétique) et administratif (bulletin d'insémination artificielle BIA). Ce dernier est une véritable synthèse de l'acte effectué et reprend toutes les informations nécessaires : identité du mâle et de la femelle concernés, date de l'intervention, rang de l'IA, référence de l'éjaculat et prix de l'intervention.

1.6. INNOVATIONS TECHNOLOGIQUES ET EVOLUTION DES PRATIQUES

Depuis quelques années, différentes firmes à travers le monde proposent des doses de semence sexée par cytométrie en flux (Johnson, 2000, Seidel, 2003) contenant 2 millions de spermatozoïdes. Leur taux de pureté pour l'un ou l'autre sexe avoisine les 90 %. De telles concentrations sont a priori incompatibles avec l'obtention de résultats de fertilité satisfaisants et l'utilisation de ces doses est réservée aux génisses avec des taux de gestation malgré tout inférieurs à ceux obtenus avec des semences non sexées : de l'ordre de 75 % de ceux obtenus avec la semence conventionnelle des mêmes taureaux. Malgré des améliorations permanentes, les rendements restent faibles : 20 à 25 % des spermatozoïdes d'un éjaculat sont exploités et seules 15 à 20 millions de cellules sont triées par heure. Récemment, d'autres méthodes commerciales ont été proposées mais celles-ci évaluées à l'aide de tests *in vitro* (UNCEIA, rapport d'activité 2007) ou à partir de données du terrain (Curry *et al.*, 2008), ne permettent pas d'observer une déviation du sexe ratio (tableau 2).

Tableau 2 : fluorescent In Situ Hybridization (FISH) sur semence séparée par swim-up (données UNCEIA)

Traitement	Nb total spz	% Y sperm	% X sperm
Témoin	1871	46,7	53,3
HeiferPlus	1633	49,4	50,6
BullPlus	1841	51,5	48,5

En dépit de ces performances médiocres, la demande en semence sexée est croissante de la part des éleveurs et des

ES. Son utilisation favorise en effet l'obtention de femelles de renouvellement en troupeau laitier et la production de mâles en élevage allaitant et permet de mieux valoriser les produits de croisement. De même, la procréation de mâles à la demande pour en faire de futurs reproducteurs pourrait modifier la gestion des schémas de sélection en engendrant des économies substantielles. Afin d'améliorer la fertilité des doses de semence sexée, la technique d'IA profonde a été largement testée, mais les résultats observés (à partir d'effectifs souvent limités) sont contradictoires, selon les conditions expérimentales et les auteurs (Gérard, 2008, sous presse). Enfin les progrès spectaculaires en génomique risquent de modifier profondément le monde de l'IA bovine en permettant de calculer un index génomique avec une précision annoncée de 0,6 dès la collecte d'un embryon et donc de s'affranchir à terme du testage sur descendance. Les jeunes taureaux seraient alors exploités dès la puberté.

2. PRATIQUES DE LA MISE EN PLACE

La réussite de l'IA, soumise à de nombreux facteurs, nécessite que la vache soit cyclée, qu'elle exprime des chaleurs, qu'elle soit détectée et inséminée pendant la phase ovulatoire et dans de bonnes conditions. Deux guides, synthétisant les bonnes pratiques et les repères essentiels ont été rédigés par le groupe « fertilité femelle » de l'UNCEIA pour les inséminateurs (Ponsart *et al.*, 2008).

2.1. CHALEURS ET MOMENT DE L'IA

La détection des chaleurs constitue un des points clefs de la réussite de l'IA à l'échelle du troupeau. Elle résulte de la combinaison de l'expression par les vaches de signes comportementaux accompagnant les ovulations et de leur observation par l'éleveur (Disenhaus, 2008). En élevage laitier, les chaleurs sont désormais plus discrètes, avec 60 % de vaches Holstein exprimant l'acceptation du chevauchement (Kerbrat *et al.*, 2004, Disenhaus *et al.*, 2005). En outre, la tâche de l'éleveur est compliquée par l'augmentation de la taille des troupeaux et un manque de disponibilité pour observer le troupeau. Pour pallier ces difficultés, des systèmes d'aide à la détection des chaleurs existent (détecteurs de chevauchement, caméras, enregistrement de l'activité, taureau vasectomisé ou dosage de progestérone). Pour être efficace, le paramètre mesuré doit être précis, facile à mesurer, répétable et si possible automatisé (Opsomer et de Kruif, 2008). Actuellement, ces outils ne remplacent pas l'observation par un animalier expérimenté. L'ovulation a lieu 24 à 30 h après le début des chaleurs, avec une grande variabilité individuelle. En 6 à 10 h, les spermatozoïdes atteignent l'ampoule de l'oviducte, lieu de la fécondation et perdent leur pouvoir fécondant après 24 h. La survie de l'ovocyte après l'ovulation est d'environ 6 h, on dispose donc d'une plage d'environ 20 h après le début des chaleurs pour inséminer (Dransfield *et al.*, 1998). Entre l'observation des signes déclenchant l'appel de l'inséminateur et l'IA, des délais compris entre 0 et 18 h ont été reliés à des taux de gestation plus élevés que pour des délais supérieurs à 24 h (Freret *et al.*, 2008).

2.2. ORGANISATION DES TOURNEES

Compte-tenu des délais à respecter entre détection des chaleurs et IA, la question est posée du bien-fondé d'organiser une ou deux tournées d'IA par jour. Si deux tournées d'IA sont organisées par jour, les vaches détectées en chaleurs en fin d'après-midi et le soir sont inséminées lors de la tournée du matin, celles détectées le matin sont inséminées l'après-midi. En cas de tournée unique, démarrant

démarrant le matin, sont inséminées les vaches en chaleurs la veille au soir ou ayant débuté leurs chaleurs dans la nuit. Dans ce cas, elles ont en général passé le cap des six premières heures au moment de l'IA. En France, on n'observe pas de différence significative des taux de réussite entre les centres pratiquant deux tournées quotidiennes et les adeptes d'une tournée unique. Cela conforte les résultats d'une étude antérieure (Nebel *et al.*, 1994) réalisée en race Holstein sur 7240 vaches (tableau 3).

Avec l'augmentation du coût du carburant et de celle du nombre de kilomètres à l'IAP due à la diminution du nombre d'exploitations, il est possible qu'à terme certaines coopératives de mise en place (CMP) optent pour la tournée unique. Il importe que chaque CMP précise ses recommandations en fonction de son organisation et qu'un dialogue permanent entre inséminateur et éleveur s'instaure afin d'optimiser le moment de l'IA.

Tableau 3 : impact de l'organisation des tournées sur les taux de réussite en race Holstein (Nebel *et al.*, 1994).

TNR 60 jours		TNR 90 jours	
1 tournée	2 tournées	1 tournée	2 tournées
64,6 %	65,6 %	58,4 %	57,8 %

2.3. PRATIQUES MISES EN ŒUVRE EN ELEVAGE

Outre la contention lors de l'IA (Ponsart *et al.*, 2007), la préparation de la semence est une étape essentielle. Les études des années 1970 ont abouti au protocole suivant : repérer l'emplacement du canister, remonter le canister à mi-col de la cuve dans les vapeurs d'azote, sortir la paillette à l'aide de pinces brucelles préalablement refroidies et la plonger le plus rapidement dans le décongélateur (température de 34 à 38°C) pendant minimum 20 secondes (paillettes fines) ou 40 secondes (paillettes moyennes, Dejarnette *et al.*, 2004). Les délais et les chocs de température lors de la décongélation impactent la qualité de la semence après décongélation (Brown *et al.*, 1991, Dejarnette *et al.*, 2000). Classiquement, il est recommandé de décongeler deux paillettes maximum en même temps. Si certaines observations américaines corroborent cette pratique (Lee *et al.*, 1997), d'autres indiquent que ce nombre est sans effet si un délai de 10 minutes et le maintien strict de la température sont respectés (Dejarnette *et al.*, 2004, Dalton *et al.*, 2004). En outre, la méthode américaine de décongélation « dans la poche » (paillette entourée d'une serviette placée 3 min dans une poche) reste sujette à caution, avec des résultats divergents (Kaproth *et al.*, 2005, Dejarnette *et al.*, 2005).

Le geste opératoire et le site de dépôt sont déterminants, l'expérience de l'opérateur impactant les taux de réussite (Dalton *et al.*, 2004). Le dépôt se fait 1 à 2 cm après la sortie du col en évitant l'entrée plus profonde du pistolet (risque de blessure). Toutefois, plusieurs auteurs ont testé des modalités d'IA profonde (dépôt de la semence dans les cornes utérines), afin de réduire les pertes de spermatozoïdes par flux rétrograde dans le mucus cervical (Larsson et Larsson, 1985, Nelson *et al.*, 1987), par phagocytose lors de la migration dans l'utérus (Hawk, 1983) et d'améliorer la survie des gamètes dans l'oviducte (Verberckmoes *et al.*, 2004). Dans une revue de Dejarnette *et al.* (2004), cinq études sur dix-sept ont montré une amélioration des taux de gestation pour un dépôt dans les cornes utérines par rapport au corps utérin). Or, l'IA profonde nécessite l'emploi d'un matériel adapté à la morphologie utérine (Verberckmoes *et al.*, 2004), des techniciens expérimentés et s'avère plus consommatrice de temps.

CONCLUSION

L'IA demeure la plus ancienne et la plus utilisée des biotechnologies de la reproduction dans l'espèce bovine.

Depuis son développement, elle a bénéficié d'évolutions techniques permanentes qui lui ont permis de perdurer malgré un contexte économique souvent difficile. Récemment, l'avènement de techniques de rupture telles que le sexage de la semence et la sélection génomique et les évolutions de la réglementation pourraient révolutionner son utilisation et le devenir du paysage de l'IA français.

- Barbat A., Druet T., Bonaïti B., Guillaume F., Colleau J.-J., Boichard D., 2005. *Renc. Rech. Rum.*, 12, 137-140
- Barth, A.D., Brito, L.F.C., Kastelic, J.K., 2008. *Therio*, 70, 485-494
- Blackshaw A.W., Emmens C.W., Martin I., Heyting J. 1957. *A.I. Digest*. 5(1): 6-8
- Brown, D.W., Senger, P.L., Becker, W.C., 1991. *J. Anim Sci.*, 69, 2303-2309
- Cassou R., 1968. 6th *Inter.Congr. Animal Reprod and Artif. Insem.* Paris. II: 1009-1012
- Curry E., Pratt S.L., Lapin D. and Gibbons J.R., 2008. *Dev. Fert. Reprod.* 20 (1), 210
- Dalton J.C., Ahmadzadeh A., Shafii B., Price W.J., Dejarnette J.M. 2004. *J. Dairy Sci.*, 87, 972-975
- Dejarnette J.M., Barnes D.A., Marshall C.E., 2000. *Therio.*, 53, 1225-1238
- Dejarnette J.M., Marshall C.E., Lenz R.W., Monke D.R., Ayars, W.H., Sttler C.G. 2004. *J. Dairy Sci.*, 87 (suppl), 93-104
- Disenhaus C., Grimard B., Trou G., Delaby L., 2005. *Renc. Rech. Rum.*, 12, 125-136
- Disenhaus C., 2008. *Nouv. Prat. Vet. El & santé*. 8 :35-39
- Dransfield M.B.G., Nebel R.L., Pearson R.E., 1998. *J. Dairy Sci.*, 81: 1874-82
- Enjalbert F., 1998. *Bull. des GTV*. 598: 21-5
- Gérard O., 1996. *Journées Nationales GTV, Angers*. 215-23
- Gérard O., 2008. *Bull. Tech. de l'IA*. 127 : 28-32
- Gérard O., Druard X., Sellem E., Humblot P. 18th *European AI Vets Meeting. Boras*, 12-14 october 2006
- Gérard O., Humblot P., 1992. *El & Ins*. 249, 9-17
- Grigal M., Nehring H., Leiding C., 2008. *XXV World Buiatrics Congress* 6-11 July 2008 Budapest, Hungary. p 297
- Hawk H.W., 1983. *J. Dairy Sci* 66:2645-60
- Humblot P., Ducrocq V., 1996. *Contraception Fertilité Sexualité*, 24, 617-623
- Hurnik J.F., King G.J., Robertson H.A. 1975. *Appl. Anim. Ethol.* 2:55-68
- Johnson L.A., 2000. *Anim. Reprod. Sci.* 60-61:93-107
- Kaproth, M.T., Pycroft, H.E., Gilbert, G.R., Abdel-Azim, G., Putman, B.F., Schenll, S.A., Everett, R.W., Parks, J.E., 2005. *Therio*, 63, 2535-2549
- Kerbrat S., Disenhaus C., 2004. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 87:223-38
- Larsson B., Larsson K., 1985. *Acta vet Scand* 26:385-395
- Lee C.N., Huang T.Z., Sagayaga A.B., 1997. *J. Dairy Sci.*, 80 (suppl), 151 (abstr)
- Martig R C., Almquist J O. 1966. *A.I. Digest*. 14(5):8-9.
- Nagase H., Niwa T., 1964. 5th *Inter.Congr. Animal Reprod and Artif. Insem.* Trento. IV:410-415
- Nebel N.L., Walker W.L., McGilliard M.L., Allen C.H., Heckman G.S. 1994. *J. Dairy Sci.*, 77, 3185-3191
- Nelson V.E., Aalseth E.P., Hawman C.H., Adams G.D., Dawon L.J., McNew R.W., 1987. *Anim Reprod Sci* 65, 401
- Opsomer G., de Kruif A., 2008. *Nouv. Prat. Vét. El & santé*. 8 : 29-34.
- Ponsart C., Frappat B., Barbat A., LeMézec P., Freret S., Seegers P., Paccard P., Humblot P., 2008. *XXV WBC, Budapest* 6-11 July, Ed. Szenci & Bajcsy, 76-87
- Sartori R.R., Sartor-Bergelt S.A., Mertens J.N., Guenther J.J., Parrish J.J., Wiltbank M.C., 2002. *J. Dairy Sci.*, 85, 2803-2812
- Sourbe O., Picard-Hagen N., Lyazrhi F., Coupet H., Hennequin M., Jacob H., Berthelot X., 2002. *El & Ins*. 310, 3-14
- Thibier M., Colchen-Burlaud., 1972. *El & Ins*. 127, 3-43
- Verberckmoes S., Van Sonn A., De Kruif A. 2004. *Reprod. Dom. Anim* 39 : 195-204