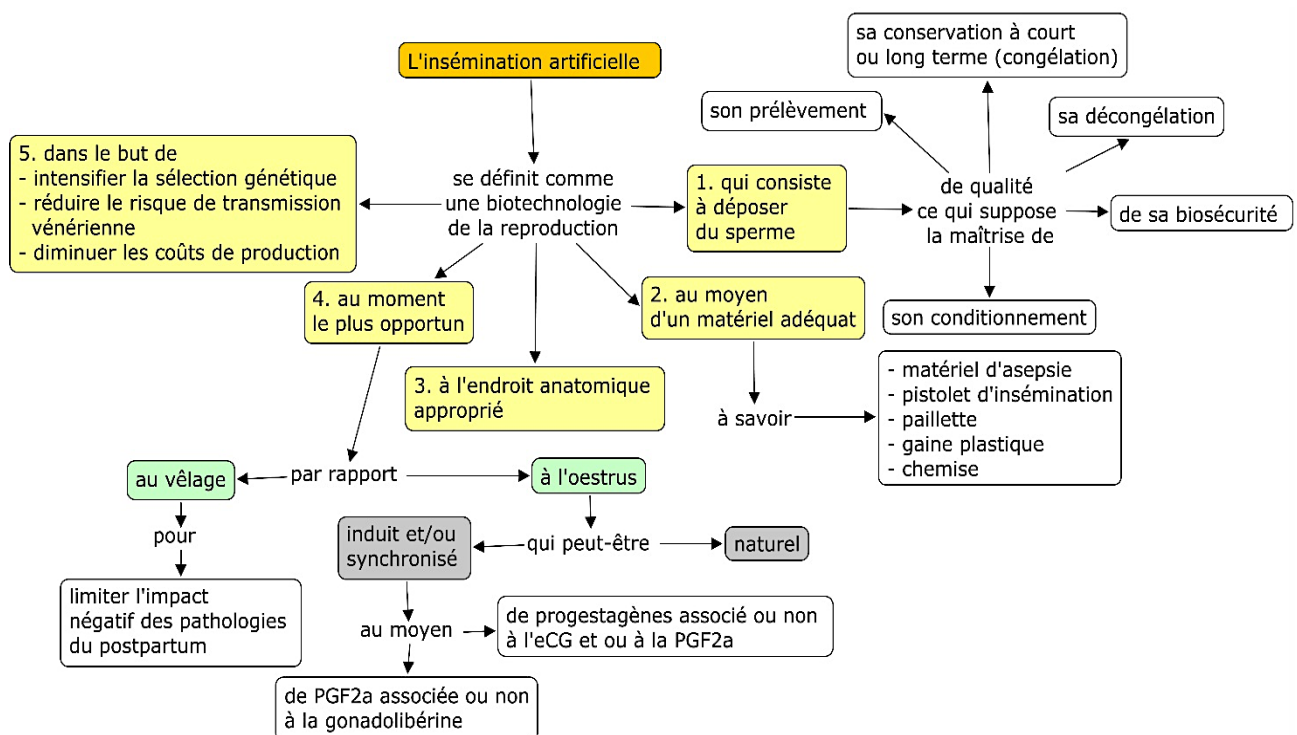


Chapitre I : L'INSEMINATION ARTIFICIELLE

Introduction

L'insémination artificielle (IA) est une technique de reproduction consistant à recueillir le sperme chez le mâle et à l'introduire dans les voies génitales de la femelle, sans qu'il y ait accouplement.

L'insémination artificielle consiste à déposer le sperme au moyen d'un instrument, au **moment le plus opportun** et à l'**endroit le plus approprié** du tractus génital femelle.



Historique de l'insémination artificielle

- Déjà utilisée par les arabes au 14^{ème} siècle sur les juments ;
- En 1779, le biologiste italien **Lazzaro Spallanzani** injecta du sperme dans le vagin d'une chienne en chaleur et l'animal accoucha 62 jours plus tard de 3 chiots ;
- Au début du 20^{ème} siècle, **Ivanov et ses collaborateurs** développent la méthode en mettant au point le **vagin artificiel** (en Russie).
- C'est avec la mise au point par **Poldge et Rowson** en 1952 de la **congélation du sperme** en azote liquide (à -196°C) que l'insémination artificielle pris réellement son essor ;
- Enfin, en 1964, pendant un colloque international sur la reproduction animale, le français **Cassou** a exposé une nouvelle méthode de préparation de la semence en paillettes.

- A l'heure actuelle, elle s'est généralisée et concerne non seulement l'espèce bovine mais les espèces équine, ovine, caprine, porcine, les volailles et les abeilles.

La méthode offre plusieurs avantages :

- **Prévention sanitaire** : à la condition que les mâles et leur troupeau d'origine soient contrôlés, la transmission de maladies vénériennes (trichomonose, campylobactériose) ou contagieuses (brucellose, tuberculose, paratuberculose, blue tongue, rhinotrachéite infectieuse bovine, etc.) est ainsi évitée.
- **Progrès génétique** : multiplier la capacité de reproduction des mâles (nombre de femelles pouvant être inséminées par un mâle) et donc d'accélérer le progrès génétique ;
- **Économie** : en utilisant l'IA, les petits éleveurs évitent les coûts d'entretien du taureau et, de plus, ils peuvent planifier la reproduction en fonction de l'alimentation disponible et des variations saisonnières.
- **Conservation des races** : en créant des banques de semences pour les races bovines en voie de métissage ou de raréfaction, c'est le patrimoine génétique qui est préservé.

I. Prélèvement du sperme

La récolte et l'examen du sperme constitue **la première opération** de l'insémination artificielle.

Le sperme (ou la semence) est généralement collecté au niveau de centres spécialisés possédant matériel animal et infrastructures spéciales tels que :

- Une aire de monte avec un « travail » fixe et adapté au gabarit des animaux ;
- Un géniteur sélectionné sur la base de ses performances de production et de son état de santé ;
- Un boute-en-train qui peut être une femelle en chaleur ou non, un mâle ou un mannequin pour la stimulation du géniteur.

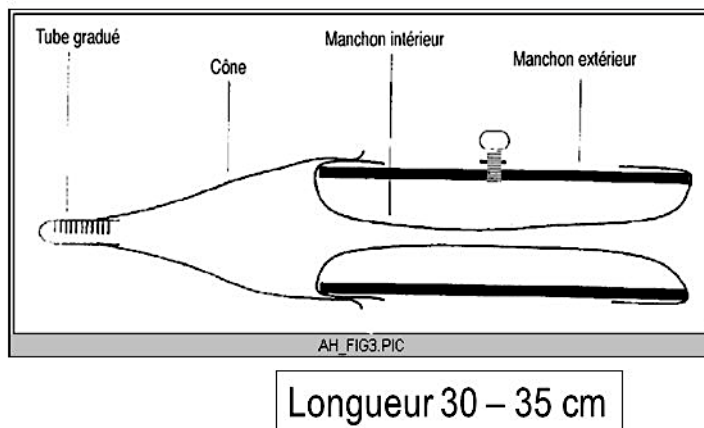
Le sperme est collecté sur des animaux reconnus indemnes de plus importantes affections et tares génétiquement transmissibles (cryptorchidisme) et provenant d'exploitations indemnes.

1.1. Le vagin artificiel

Le vagin artificiel constitue le moyen classiquement utilisé quel que soit l'espèce animale. Il comporte deux parties :

- Le corps : un cylindre extérieur en matériel rigide le plus souvent en caoutchouc dur et épais (isolation thermique) ou en plastique muni d'une ouverture fermée par un bouchon. Ses dimensions (longueur et diamètre externe) varient selon l'espèce et l'âge de n'animal.

- La chemise intérieure en latex ou en caoutchouc artificiel (**manchon**) est introduite dans le cylindre externe et ses extrémités rabattues et maintenues par un élastique. La cavité ainsi formée par le cylindre externe et la chemise interne est remplie d'eau à température qui varie selon l'espèce et en quantité suffisante pour obtenir une pression équivalente à celle du vagin de la femelle.
- Une extrémité du vagin artificiel est lubrifiée : elle servira à introduire le pénis. Sur l'autre extrémité un cône en caoutchouc est fixé, au bout duquel un **tube en verre** ou en **plastic** gradué est adapté pour recueillir le sperme. L'ensemble sera fixé au moyen de deux lanières en caoutchouc.
- Si le vagin choisi n'est pas adapté, il risque de le blesser l'animal, souillant ainsi le prélèvement ou entraînant un risque de refus de l'animal pour les prélèvements ultérieurs.



Diamètre
6 à 8 cm

Longueur 30 – 35 cm

(N. Hagen ENVT)

Figure 1 : Schéma d'un vagin artificiel adapté au taureau.



1.1.1. Taureau

Dans cette espèce, la température de l'eau de remplissage (40°C) est plus importante que la pression. Aussi est-il recommandé de maintenir si possible le vagin dans une étuve à 45°C et ne le remplir que dans les minutes précédant le prélèvement.

Une surpression est déconseillée car elle risque de ne pas laisser au pénis une place suffisante lors de l'éjaculation et d'entraîner un éclatement de la paroi interne et donc une contamination du prélèvement par de l'eau. Un remplissage correct se traduit lorsque l'ouverture du vagin en position verticale simule une fente vaginale.

La récolte se fera autant que possible dans un endroit calme pour éviter toute situation stressante à l'animal et sur un sol non glissant et non pulvérulent (contamination du prélèvement) pour assurer un saut optimal de l'animal et le confort de l'opérateur.

Le recours à un animal bête en train est préférable mais non indispensable. Cet animal sera idéalement placé dans un travail de contention dégageant l'arrière train.

Les centres d'insémination utilisent des mannequins (vache mécanique). Une vache peut être utilisée. L'inconvénient est le risque de saillie naturelle. Sa résistance dépendra de son état de chaleurs. Un mâle peut être utilisé pour des animaux entraînés.

On veillera à réaliser le prélèvement dans de bonnes conditions hygiéniques : lavage de l'extrémité du fourreau, désinfection du vagin artificiel.

Deux à trois fausses montes seront réalisées avant le prélèvement proprement dit. Elles auront pour objectifs d'augmenter l'état d'excitation du taureau et améliorer donc les principales caractéristiques du sperme (volume, nombre de spermatozoïdes vivants).

Lors du cabrer de l'animal, le pénis sera dirigé au moyen de la main appliquée sur le fourreau vers l'ouverture du vagin artificiel celui-ci étant dirigé de bas en haut selon un angle de 45° et légèrement vers l'extérieur. Lors du prélèvement, on évitera toute déviation excessive du pénis.

L'excitation sensorielle de la chaleur humide entraîne le réflexe d'intromission dans un puissant coup de rein qu'accompagne l'opérateur. L'éjaculation proprement dite est le plus souvent immédiate, rapide et même parfois brutale. Sitôt après, le taureau redescend.

Une fois le prélèvement réalisé, le vagin est retourné de manière à recueillir le sperme dans le tube de récolte. Ce dernier sera le cas échéant protégé d'un choc thermique éventuel par une enveloppe isothermique (de l'ouate, du tissu).

Habituellement, deux prélèvements seront réalisés au cours de la même séance.

1.1.2. Bélier

Le type de vagin artificiel est comparable à celui utilisé chez le taureau mais il est de dimensions plus réduites. Sa température doit se situer entre 41 et 44°C. L'animal de monte peut être une brebis en chaleurs ou non, un bélier ou une brebis traitée aux œstrogènes. Les béliers peuvent être entraînés à donner du sperme en-dehors de la période de reproduction proprement dite. Trois à huit éjaculats espacés de 15 minutes peuvent être ainsi recueillis en une journée.

1.1.3. Etalon

Avant de pouvoir récolter la semence, la première étape est d'accoutumer le cheval. La monte demande un effort pour l'étalon, il lui faut donc une séance d'échauffement. Son groom lui fait faire des tours de manège à la longe pendant une quinzaine de minutes.

Ensuite, Il faut exciter l'étalon, en présence d'une jument en chaleur. Une fois qu'il l'a sentie et qu'il est prêt, on fait grimper le cheval sur le mannequin en faisant dévier son pénis dans le vagin artificiel. Le sperme est recueilli dans l'éprouvette. Cela dure quelques secondes, l'étalon est ensuite mis au repos au box.

1.1.4. Bouc

La température du vagin artificiel sera de 44-45°C. Le temps nécessaire à l'obtention d'un éjaculat varie avec les individus. Les mâles de bonne ardeur sexuelle peuvent donner deux éjaculats au cours de la même séance.

1.2.L'électro-éjaculation

L'électroéjaculation est également d'application dans les espèces bovine, ovine, canine et les volailles. Elle consiste à provoquer l'émission de sperme par l'excitation électrique des nerfs érecteurs et éjaculateurs.

Réalisée sur animal debout ou couché, la méthode est le plus souvent appliquée aux animaux qui faute d'érections normales, de lésions articulaires ou du refus du vagin artificiel ne peuvent être récoltés au moyen d'un vagin artificiel.

Utilisé pour la première fois par *Eckart* chez le chien en 1863, le procédé fut amélioré par *Laplaud* et *Cassou* en 1945.

L'appareillage comporte une **sonde rectale** de forme ogivale munie d'électrodes bipolaires parcourues d'un courant d'intensité moyenne mais de bas voltage, alimentées par batterie ou par secteur au moyen d'un transformateur, ce dernier permettant d'avoir une tension constante. Le **rhéostat** permet de faire varier les caractéristiques du courant de manière à obtenir le cycle nécessaire à l'obtention de l'écoulement du sperme.

1.2.1. Taureau

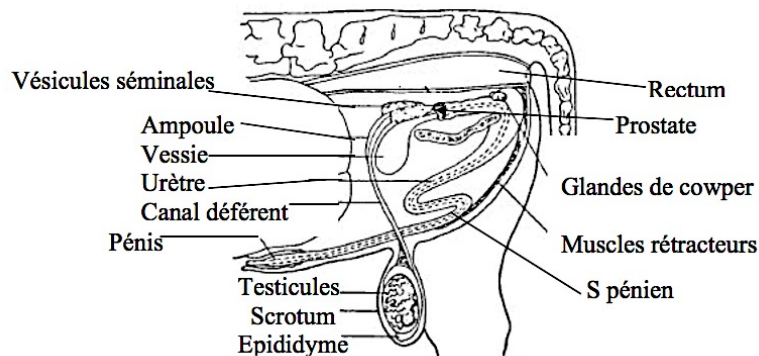


Figure 2 : Appareil reproducteur du taureau (THIBIER, 1977).

Il existe divers types d'électro-éjaculateurs. Les sondes de large diamètre induisent une plus forte réponse à la stimulation pour une impulsion électrique donnée que les sondes de petit diamètre. Il semble que pour les taureaux pesants entre 550 et 900 kg, des sondes de diamètre compris entre 6,5 et 7,5 cm constituent un compromis idéal.

Les sondes modernes comportent trois électrodes séparées d'un cm et situées sur la partie ventrale de la sonde. La disposition des électrodes tout autour de la circonférence de la sonde (anciens modèles) entraînerait une stimulation excessive des muscles du train postérieur. Ces sondes devraient être introduites dans le rectum en deux temps : sur 2/3 de leur longueur environ jusqu'au moment où le pénis s'exteriorise et complètement ensuite pour induire l'éjaculation.

L'animal sera placé dans une cage de contention. L'extrémité du fourreau sera nettoyée et ses poils coupés pour éviter toute contamination. Une palpation manuelle du rectum permet de le débarrasser de ses matières fécales, de masser les vésicules pour en extraire partiellement le liquide séminal et de préparer ainsi l'animal aux stimulations électriques. Un drainage du rectum au moyen de 2 à 3 litres d'eau salée facilite l'évacuation du rectum et augmente le contact entre l'électrode et la paroi rectale.

La sonde est lubrifiée au moyen d'un lubrifiant et progressivement introduite dans le rectum. Lors des 10 premières impulsions, une fraction liquide transparente peut être observée. C'est le liquide

séminal qui n'est le plus souvent pas recueilli. La fraction devient ensuite plus crémeuse. Elle est collectée au moyen d'une éprouvette placée au bout d'un entonnoir fixé à un manche. Au besoin, le pénis sera sorti pendant les stimulations en repoussant vers l'avant la courbure sigmoïde. Le cas échéant, son extrémité peut être saisie pour récolter le sperme. Cette façon de faire permet de contrôler les stimulations sur le pénis.

Les qualités du sperme recueilli ne sont pas modifiées par le type de prélèvement utilisé. Un volume plus important de sperme est habituellement recueilli par électroéjaculation. L'aptitude à la congélation et le pouvoir fécondant sont comparables. La tranquillisation préalable de l'animal avant la stimulation réduit les chances de prélèvement.

Le vagin artificiel augmente le risque de lésions de la verge. Le problème majeur de l'électroéjaculateur réside dans le fait que 25 % des jeunes taureaux et 2 % des taureaux âgés de plus de deux ans s'affaissent en cours de prélèvement suite à la tétanisation des membres postérieurs. L'investissement d'un vagin artificiel est 5 fois moindre que celui d'un électroéjaculateur.

1.2.2. Bélier

Le bélier répond très bien et plus rapidement que le taureau à la méthode de collecte par électroéjaculation. L'animal est maintenu debout ou couché sur une table. Le pénis et son appendice terminal filiforme sont extériorisés et introduits dans le tube de récolte avant que ne survienne l'éjaculation qui en général apparaît au bout de trois à quatre stimulations de 2 à 8 volts.

1.2.3. Autres espèces

La méthode a également été appliquée chez le chat.

1.3. Autres méthodes

Chez le taureau, le massage transrectal du tractus génital interne (vésicules séminales) a été proposé comme méthode. Elle est indiquée pour des animaux présentant des lésions de l'appareil locomoteur. Si au bout de 2 à 3 minutes, aucun résultat n'est obtenu, il faut envisager une autre méthode.

Chez le chien, le massage mécanique du fourreau et du pénis est d'application.

II. Examen du sperme

L'évaluation de la qualité du sperme a pour objectif d'apprécier ses caractéristiques afin de définir le niveau possible de sa dilution. Elle permet ainsi de préparer une semence correspondant à l'optimum biologique et économique recherché. Elle comporte des examens macroscopiques, microscopiques, physico-chimiques et biochimiques.

2.1.Examens macroscopiques

2.1.1. Volume

La quantité de sperme varie selon les espèces et pour une espèce donnée, selon l'état physiologique de l'individu, l'âge, la saison, les méthodes de récolte, la race ou encore les conditions sanitaires et alimentaires.

On distingue habituellement les espèces à insémination de type utérin (cheval, porc, chien) chez lesquelles le sperme est abondant et peu concentré tandis que l'inverse est vrai pour les espèces de type vaginal (ruminants, lapin).

	Taureau	Bélier	Bouc	Verrat	Etalon	Chien	Homme
Durée éjaculation	1-2 sec	1-2 sec	1-2 sec	10 min	5 sec	15-30 min	1-2 sec
Volume (ml)	3-8	0,8-1,2	0,5-1,5	50-250	60-100	5-20	2-6
Concentration (x1000 /mm ³)	500-2500	1500-6000	3000-6000	150-300	50-100	500-1000	50-150
N total en spz (Milliards)	4-8	1,6-3,6	1,5-6	30-60	5-15	2-5	0,3-1

2.1.2. Aspect et consistance

Le sperme normal est un liquide crémeux, épais, légèrement jaunâtre ou grisâtre selon les espèces consistant en une suspension de spermatozoïdes dans le plasma séminal. Il devient plus clair au fur et à mesure que la concentration en spermatozoïdes diminue.

Le sperme du taureau et du bélier est de consistance laiteuse et de coloration blanchâtre. Le sperme de bélier est blanc crémeux, plus dense et plus opaque que celui du taureau.

2.1.3. Couleur

Le plus souvent blanchâtre, la couleur des spermes peut être modifiée pour des raisons physiologiques (concentration) mais le plus souvent pathologiques.

Certains taureaux ont un sperme de couleur jaunâtre imputable à la présence d'un lipochrome provenant des vésicules séminales et dont la présence est sans rapport avec l'alimentation. Cette couleur jaune peut également résulter de la présence de pus ou d'urine ce qui compromet le pouvoir fécondant du sperme.

La coloration rosée ou rougeâtre résulte de la présence de sang ou peut faire suite à l'administration prolongée de phénothiazine. Quelques gouttes ou ml de sang peuvent parfois apparaître à la fin de l'éjaculation. Elles disparaissent le plus souvent spontanément et n'interfère pas avec la fécondation. Leur présence résulte vraisemblablement de ruptures de micro vaisseaux. Le plus souvent la présence d'éléments figurés du sang n'interfère pas avec la fertilité étant donné la présence dans le plasma séminal d'hémagglutinines qui éliminent ces corps étrangers par agglutination.

La coloration brunâtre témoigne de la présence d'éléments sanguins dégénérés. La coloration bleuâtre résulte d'une faible concentration ou de l'administration de bleu de méthylène.

2.1.4. Viscosité, pH

La viscosité dépend de la concentration en spermatozoïdes. Comparée à l'eau distillée (1), la viscosité du sperme de taureau est de 3.7. Elle dépend également de sa conductibilité électrique c'est-à-dire de sa concentration en ions.

La mesure du pH (pH-mètre, papier indicateur) doit être immédiate, le sperme s'acidifiant rapidement étant donné la formation d'acide lactique. Sa valeur normale doit être comprise entre 6.5 et 6.8. D'une manière générale, les spermatozoïdes forts concentrés et riches en fructose accusent une diminution plus rapide du pH que les autres du fait de l'accumulation plus rapide d'acide lactique due à une glycolyse plus intense ce qui indirectement témoigne leur meilleure qualité.

2.1.5. Recherche des polynucléaires

Il est possible de réaliser sur le sperme le test de Schalm (CMT - Californien Mastitis Test). Pour ce faire 0.5 ml de sperme sera mélangé à 2.5 ml de Teepol. Le degré de gélification sera noté comme pour le lait.

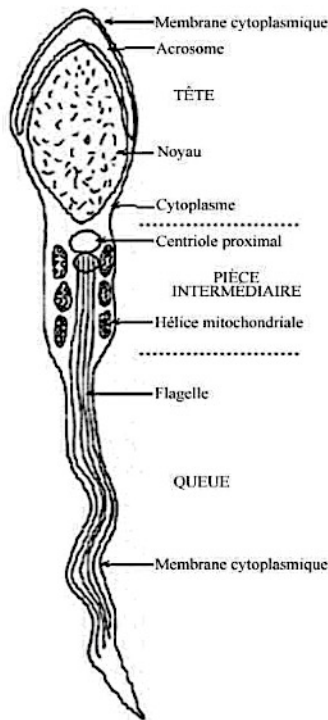
2.2.Examen microscopique du sperme

L'examen microscopique sera réalisé dans les minutes suivant le prélèvement et selon la nature des examens microscopiques en respectant les conditions thermiques optimales. Il est également possible

de conserver à plus long terme (1 mois) un échantillon de sperme en diluant 0.5 à 1 ml dans une solution saline et formolée avant son stockage au réfrigérateur (Solution de Hancock).

2.2.1. Détermination de la motilité massale

La motilité du spermatozoïde est due à la contraction du filament axial. L'examen de la motilité doit



se faire le plus rapidement possible après le prélèvement en le maintenant rigoureusement à une température voisine de 38°C. La progression des spermatozoïdes est habituellement rectiligne. Au cours de leur déplacement, ils subissent une rotation autour de leur grand axe.

Dans la queue de l'épididyme, les spermatozoïdes sont immobiles. Leur motilité dépend de leur présence dans un milieu de pH et de température normale, renfermant en quantités adéquates nutriments et ions, conditions offertes une fois qu'ils sont présents dans les sécrétions séminales. On comprend ainsi aussi pourquoi leur motilité peut facilement être inhibée en cours de prélèvement par la présence de contaminants chimiques sur les lames, ou d'urine.

Figure : schéma de la morphologie du spermatozoïde mûr.

Chez le taureau, l'intensité et le nombre des mouvements se traduisent par de véritables vagues observables après dépôt d'une goutte de sperme sur une lame préchauffée et son examen au faible grossissement (40 à 125) si possible au moyen d'un microscope à contraste de phase. Sur une échelle d'évaluation de 1 à 4 :

- Un sperme de **très bonne qualité** (4) montre des tourbillons noirs et rapides.
- S'il est de **bonne qualité** (3), ces tourbillons seront moindres et plus clairs.
- S'il est de **qualité correcte** (2), les tourbillons ne sont plus visibles et on devine la présence d'une mobilité individuelle.
- S'il est enfin de **mauvaise qualité** (1), il n'y a presque plus voire plus de mobilité individuelle.

L'examen de la motilité massale ne donne qu'une idée fort approximative du pourcentage de spermatozoïdes mobiles. Mieux vaut donc recourir à l'examen de la motilité individuelle.

2.2.2. Détermination de la motilité individuelle

L'examen de la motilité individuelle ("progressive motility") sera préférentiellement réalisé une fois **après dilution** (10 à 40 fois) du sperme dans un dilueur ("extender") ou dans du sérum physiologique préalablement chauffé. Ces milieux seront idéalement préparés avant l'examen pour éviter toute modification de pH, préjudiciable à la motilité des spermatozoïdes. La motilité sera déterminée au moyen d'un microscope à contraste de phase en plaçant une goutte de sperme entre lame et lamelle. Trois à cinq champs proches du centre de la goutte, seront ainsi examinés au grossissement 200 à 500 et la moyenne sera calculée.

La motilité d'un spermatozoïde peut être considérée comme bonne quand il traverse le champ du microscope relativement rapidement avec des mouvements de rotation de la tête (spermatozoïdes fléchants ou traceurs). Certains (50 %) spermatozoïdes présentent des mouvements circulaires imputables à l'implantation abaxiale de leur queue. D'autres se déplacent de manière curviligne ou plus lentement.

Les analyseurs d'image de type CASA (Computer Assisted Sperm Analysis) permettent de quantifier de manière plus précise la nature et la vitesse des déplacements.

- Un sperme de très **bonne qualité** (4) doit posséder au moins 80 à 100 % de spermatozoïdes mobiles.
- Un sperme de **bonne qualité** (3) aura 60 à 79 % de spermatozoïdes mobiles.
- Un sperme de **qualité correcte** (2) aura 40 à 59 % de spermatozoïdes mobiles.
- Un sperme de **mauvaise qualité** (1) aura moins de 40 % de spermatozoïdes mobiles.

L'examen de la motilité individuelle est intéressant car elle fournit indirectement des informations intéressantes sur l'intégrité de la membrane du spermatozoïde et son intégrité morphologique.

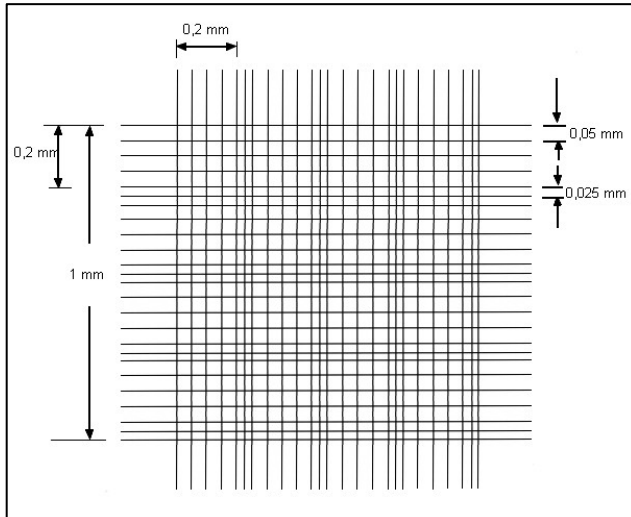
2.2.3. Détermination de la concentration

La concentration exprime le nombre de spermatozoïdes par mm³. Elle peut être déterminée :

- ✓ Directement par comptage des spermatozoïdes au moyen d'une cellule hématimétrique ;
- ✓ Par comptage électronique ;
- ✓ Par néphélométrie (ou néphélémétrie) qui consiste à apprécier la concentration en spermatozoïdes en évaluant l'opacité de la suspension au moyen d'un spectrophotomètre ou d'un colorimètre. Cette opacité peut cependant être indirectement augmentée suite à la

présence de débris cellulaires. Cette méthode est moins exacte chez les espèces dont le plasma séminal présente de grandes variations d'opacité (verrat, étalon) ;

- ✓ La détermination du volume cellulaire par centrifugation.



La **numération directe** se fait au moyen d'un hématimètre. L'hématimètre est constitué d'une lame de verre, creusée d'une petite cuvette dont le fond est garni d'un quadrillage. La cellule de Thoma comporte un quadrillage de 16 grands carrés comprenant chacun 16 petits carrés. La surface des grands carrés est égale à 1 mm². La chambre de numération a une hauteur de 0.1 mm.

Figure : Schéma d'une cellule de Thoma

Ce type de numération suppose la **dilution préalable du sperme** dans une solution susceptible de disperser et de tuer les spermatozoïdes : solution de chlorure de sodium à 3 % ou solution de formaldéhyde à 1 % (solution de Hancock). Le taux de dilution dépend de la concentration apparente du sperme. On conseille une dilution de 1 % pour les spermés de taureau, de bélier et de bouc.

Après dépôt d'une goutte de sperme et son recouvrement par une lamelle, le nombre de spermatozoïdes est déterminé au grossissement 10 x 40 sur une surface correspondant à 4 grands carrés. Par convention, on ne prend en compte que les têtes des spermatozoïdes situés à l'intérieur des deux lignes parallèles délimitant chaque grand carré ou dont la tête se trouve sur les lignes gauche et supérieure délimitant un grand carré.

Le calcul de la concentration se fait de la manière suivante :

$$\text{Concentration} = N \times 4 \times 10 \times D$$

- ✓ **N** : est le nombre de spermatozoïdes comptés dans 4 grands carrés (pour le verrot les spermatozoïdes sont le plus souvent dénombrés sur 10 grands carrés et la règle de trois est appliquée pour compter les spermatozoïdes sur l'ensemble des carrés).
- ✓ **4** : puisque l'hématimètre comporte 16 grands carrés d'une surface totale égale à 1 mm².
- ✓ **10** : puisque la hauteur de la chambre de numération est égale à 0.1 mm.
- ✓ **D** : c'est-à-dire le degré de dilution.

2.2.4. Examen morphologique

Le spermatozoïde peut être considéré comme une biopsie du tissu testiculaire. Son examen morphologique permet de mieux identifier le caractère normal ou non de la spermatogenèse. Celle-ci est surtout influencée par deux groupes de facteurs les uns liés à la température, les autres au stress. D'autres facteurs moins communs sont parfois impliqués : facteurs génétiques, facteurs nutritionnels, l'âge.

2.2.4.1. Principes généraux

L'examen morphologique nécessite la **coloration du sperme**. Pour ce faire, une goutte de sperme est déposée à l'extrémité d'une lame et étendue en couche mince au moyen d'une autre lame inclinée à 45°. La préparation est séchée à l'air libre en quelques minutes. Le frottis est ensuite fixé par immersion dans une solution d'alcool méthylique ou dans une solution de formaline à 5 %. La fixation à l'air libre est également possible comme celle consistant à passer rapidement le frottis au-dessus d'une lampe à alcool. Tout choc thermique sera néanmoins évité pendant ces préparations. Les éjaculats trop concentrés seront avantageusement dilués.

Certaines colorations ont pour objet de mieux faire apparaître la morphologie du spermatozoïde (**coloration totale**), les autres dites **vitales** permettent de différencier les spermatozoïdes morts et vivants.

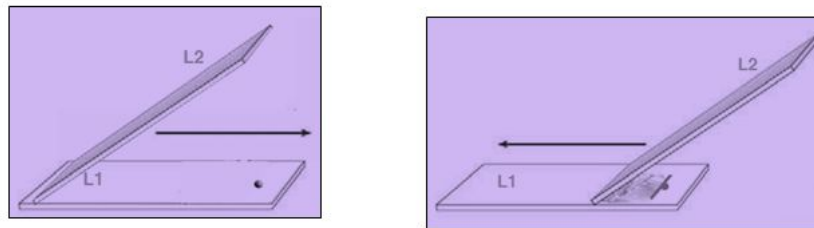
Parmi les colorations totales, certaines sont dites **simples** (encre de Chine, bleu de méthylène, bleu de toluidine, violet de gentiane, fuschine, etc.) : elles fournissent une coloration uniforme des spermatozoïdes tandis que les secondes dites **double** (Giemsa, Williams) et font mieux apparaître les différences structurales au niveau de la tête, de l'acrosome ou de la pièce intermédiaire.

La coloration à l'encre de Chine est dite négative car les spermatozoïdes apparaissent en clair sur le fond noir de l'encre de Chine. La préparation en est simple : le frottis réalisé au moyen du mélange d'une goutte de sperme et d'une goutte d'encre de Chine est laissé sécher à l'air libre. Cette coloration identifie bien la forme de la tête ainsi que la présence éventuelle d'une gouttelette protoplasmique.

La coloration vitale a pour principe d'utiliser un colorant qui ne traverse que les membranes des cellules mortes (éosine, rose Bengale, vert de Crésyl) et un colorant de fond qui facilite la lecture (bleu de méthylène, nigrosine). La coloration éosine-nigrosine est classiquement utilisée.

On évitera la formation d'artefacts en respectant les principes suivants : éviter tout choc thermique en opérant à 37°C (platine chauffante, étuve thermostatique) ; utiliser des colorants en solution isotonique de pH égal à 6,8, standardiser la durée de la coloration, employer un mélange sperme-colorant compris entre 1/1 et 1/20.

La dilution préalable du sperme (2 gouttes dans 0,5 ml de sérum physiologique ou de dilueur) en facilitera l'examen morphologique. Une goutte de sperme dilué et coloré sera placée à l'extrémité d'une lame chauffée pour en faire l'étalement. Cela permet d'obtenir par champ microscopiques 15 à 25 spermatozoïdes, nombre optimal pour en faire l'analyse morphologique. Dans ces conditions en effet, le fond du frottis est suffisamment coloré et permet de bien distinguer les spermatozoïdes. Si le sperme est particulièrement dilué, il faudra centrifuger préalablement le prélèvement. L'examen sera idéalement réalisé avec un objectif à immersion et au grossissement 1000 à 1250.



100 spermatozoïdes seront comptés voire plus si le nombre de spermatozoïdes est plus important. Les spermatozoïdes morts seront colorés en rouge, l'éosine y ayant pénétré étant donné les modifications de perméabilité membranaire.

Remarque : un pourcentage élevé de spermatozoïdes mobiles joint à un pourcentage élevé de spermatozoïdes morts donnera à penser à une mauvaise manipulation du sperme plus qu'à un sperme anormal.

2.2.4.2. Anomalies morphologiques

Les anomalies morphologiques des spermatozoïdes peuvent être :

- ✓ **Primaires** (1) si elles trouvent leur origine pendant la phase de spermatogenèse (testicule) ;
- ✓ **Secondaires** (2) si elles surviennent pendant leur phase de maturation (épididyme) ;
- ✓ Certaines peuvent être à la fois primaires et secondaires comme la présence de gouttelettes, les têtes sans queue.

Les lésions du spermatozoïde peuvent également être qualifiées de majeures ou de mineures selon qu'elles exercent ou non un effet négatif sur la fertilité.

Lésions majeures	
Tête	Queue
Lésion en bouton de l'acrosome	Gouttelette cytoplasmique proximale
Aspect piriforme	Enroulement total
Vacuoles nucléaires (lésion en diadème)	Aspect en tire-bouchon
Absence de queue	
Lésions mineures	
Tête	Queue
Micro et macrocéphalie	Gouttelette cytoplasmique distale
	Extrémité de la queue recourbée
	Implantation abaxiale

La notion d'anomalies peut également se concevoir en terme de **capacité ou non pour le spermatozoïde d'atteindre l'endroit et d'assurer la fécondation de l'ovocyte** (compensable trait) et/ou d'assurer la fécondation de l'ovocyte mais aussi les premiers stades du développement embryonnaire (uncompensable trait).

Au nombre des premiers on peut noter une concentration insuffisante de l'éjaculat d'un taureau, facteur qu'il est possible de compenser en augmentant la concentration de la paillette par exemple. Au nombre des seconds on peut noter des éjaculats normaux mais renfermant une proportion trop importante de spermatozoïdes porteurs de vacuoles nucléaires (cratères ou diadèmes). Leur utilisation s'accompagne d'une réduction du taux de fertilisation et d'une diminution de la qualité des embryons.

a. Anomalies de la tête

- **Lésion en bouton de l'acrosome** (Knobbed acrosome defect) : Cette anomalie s'identifie sur base de l'observation d'un aplatissement ou d'un découpage anormal de la courbure de l'acrosome. Cette anomalie apparaît pendant la spermiogénèse. Un grossissement x 1000 est nécessaire à son identification. Cette anomalie semble être liée à un gène autosomal récessif. Elle exerce un effet négatif majeur sur la fertilité.
- **Tête piriforme ou fuselée** : C'est une des anomalies de la tête la plus fréquemment rencontrée (10 % des taureaux de 2 à 12 ans concernés). Le plus souvent, l'aspect piriforme résulte de

l'aspect plus effilé de la zone postacrosomique, la zone acrosomiale étant par ailleurs normale. Le rétrécissement concerne parfois tout à la fois la zone acrosomiale et postacrosomiale. L'héritabilité de ce type d'anomalie ainsi que ses effets négatifs sur la fertilité ont été démontrés.

- **Vacuoles nucléaires** (spermatozoïde en diadème) : Cette anomalie consiste en la formation de vacuoles unique ou multiples, de taille variable dans le noyau. Elles sont localisées à l'apex ou se rassemblent en un diadème à la jonction acrosomique et postacrosomique. Une coloration Feulgen du noyau et un grossissement x 1000 en facilitent l'identification. Ces vacuoles résultent de l'invagination de la membrane nucléaire dans le cytoplasme.
- **Condensation anormale de l'ADN** : Cette anomalie peut s'identifier après une coloration du spermatozoïde par le colorant de Feulgen. La chromatine nucléaire se présente sous la forme de zones régulièrement et irrégulièrement colorées. Rarement décrite, cette anomalie a un effet majeur sur la fertilité.
- **Tête détachée** : L'identification d'un faible pourcentage (5 %) de têtes sans queue est classique. L'augmentation de ce pourcentage (> 30 voire 40 %) a été associée à de l'hypoplasie ou de la dégénérescence testiculaire ou à une inflammation des glandes annexes. Empêchant le déplacement normal du spermatozoïde elle est responsable d'infertilité.
- **Micro et macrocéphalie** : Cette anomalie résulterait d'une distribution anormale des chromosomes lors de la division méiotique. Ces spermatozoïdes meurent le plus souvent avant d'avoir atteint le stade de spermatide. Elle serait sans effet sur la fertilité.

b. Anomalies de la queue

La majeure partie de ces lésions concerne la **pièce intermédiaire**. Celles relatives à la pièce principale de la queue consistent en la présence de temps à autre de boucles et autres enroulements possibles de cette partie de la queue. Elles résultent le plus souvent des préparations du frottis comme par exemple l'exposition prolongée du sperme à des solutions hypotoniques. Il ne semble donc pas qu'elles aient une connotation pathologique importante.

- **Courbure de l'extrémité distale de la pièce intermédiaire (DMR : Distal midpiece reflex)** : Chez le taureau, elle constitue l'anomalie la plus fréquente de la queue. Elle affecte pratiquement tous les taureaux dans toutes les races. L'incidence de cette anomalie est comprise entre 23 et 55 %, 8 % en moyenne des taureaux examinés étant touchés.

La pièce intermédiaire à une forme typique en J ou en bâton de berger. D'autres formes sont également possibles dont celle où la pièce intermédiaire est recourbée à 180°. Habituellement, on peut observer une gouttelette cytoplasmique au niveau de la courbure néoformée. Il en résulte une orientation anormale du flagelle et une progression du spermatozoïde à contre-courant. Il ne semble pas cependant qu'une telle anomalie puisse engendrer de manière permanente de graves problèmes de fertilité.

- **Lésion dite de Dag (Dag defect) :** Le signe majeur de cette lésion concernant la partie intermédiaire de la queue consiste en la rupture ou fracture de ses éléments constitutifs. Il en résulte son aspect spiralé voire plissé à distinguer du DMR. Cette lésion serait due à un gène récessif.
- **Gouttelettes cytoplasmiques :** Les gouttelettes cytoplasmiques (2 à 3 microns) peuvent être localisées en position proximale près de la tête du spermatozoïde ou en position distale au bout de la pièce intermédiaire. Cette lésion est très fréquente. Lors de la spermatogenèse, la majorité du cytoplasme nucléaire est enlevé par les cellules de Sertoli. Il peut cependant arriver que lors de la spermiation, une partie de ce cytoplasme demeure accroché au niveau de la pièce intermédiaire. Cette gouttelette migre lors du transit épидидymaire d'une position proximale vers une position distale puis est libérée avant l'éjaculation. La présence de gouttelettes proximales a été associée à un trouble de la spermatogenèse et celle d'une gouttelette distale à celui de la maturation. Cette anomalie est plus fréquente chez les animaux jeunes. Chez les adultes, elle peut être induite par un trouble de la thermorégulation testiculaire. Une fréquence de 5 à 10 % de cette anomalie est susceptible d'entraîner des troubles de la fertilité. La gouttelette proximale est souvent associée à d'autres anomalies.
- **Implantation abaxiale de la queue :** Elle ne semble pas selon certains auteurs devoir être considérée comme une anomalie au sens strict puisqu'étant sans effet sur la fertilité mais comme une particularité morphologique. Elle est parfois associée avec la présence d'une queue accessoire.
- **Queue en moignon :** Un examen attentif de la base de la tête fait voir un petit bout de queue. La difficulté de l'identification de cette anomalie l'a souvent confondu avec celle d'une tête sans queue. Le sperme des taureaux atteints est souvent peu concentré et le pourcentage de spermatozoïdes mobiles faible. Cette anomalie a également été décrite chez l'homme et l'étalon. Cette lésion semble être irréversible. La cause n'en est pas connue.

- **Pièce intermédiaire en U ou en arc-en-ciel** : Il semblerait que cette anomalie traduise simplement la perte de mobilité par un spermatozoïde, ce dernier dessinant une large courbe avant de mourir...
- **Pièce intermédiaire en tire-bouchon** : Rare cette anomalie résulte d'une dégénérescence ou d'une aplasie de l'enveloppe mitochondriale de la pièce intermédiaire, conséquence possible d'une dégénérescence testiculaire.

Une faible motilité est souvent corrélée avec un pourcentage élevé de formes anormales ou de spermatozoïdes morts.

2.2.5. Examen bactériovirologique

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

2.2.6. Examens complémentaires

La glycolyse et la respiration constituent les deux principales activités métaboliques des spermatozoïdes. Elles sont étroitement dépendantes de la concentration et de la motilité des spermatozoïdes. En l'absence d'oxygène, les spermatozoïdes trouvent leur principale source d'énergie dans le métabolisme des hydrates de carbone et du fructose notamment, présent en grandes concentrations dans les vésicules séminales.

L'**index de fructolyse** se définit comme la quantité de fructose (mg) utilisée par un milliard de spermatozoïdes en une heure à 37°C. Sa valeur normale est comprise entre 1,4 et 2.

D'autres **tests complémentaires** peuvent être réalisés en vue d'évaluer l'intégrité de la membrane plasmique (coloration à l'éosine-nigrosine, au moyen de fluorochromes, test hypo-osmotique), de l'acrosome (examen direct ou indirect après induction de la réaction acrosomiale), du noyau (test de décondensation de la chromatine).

L'examen microscopique permet de poser le diagnostic de l'une ou l'autre anomalie dont il est important de rapporter les définitions. On parlera de :

- **asthénospermie** ou d'**asthénozoospermie** si la motilité individuelle est inférieure à 30 % ou si la note de motilité massale est inférieure à 2.
- **Azoospermie** en cas d'absence de spermatozoïdes dans l'éjaculat.
- **Nécrospermie** si l'on observe une proportion élevée de spermatozoïdes morts.
- **Oligospermie** traduit une concentration faible en spermatozoïdes ($< 300.000 / \text{mm}^3$).
- **Teratospermie** ou **teratozoospermie** traduit la présence d'une proportion élevée en spermatozoïdes anormaux ($> 30 \%$).

III. Dilution du sperme

Si l'éjaculat est de bonne qualité, le processus continue et un taux de dilution est calculé pour ramener chaque dose à un nombre donné de spermatozoïdes mobiles : au moins 8 millions de spermatozoïdes mobiles par dose **au moment de l'emploi**.

Chez les ruminants, l'étape préliminaire visant à séparer la fraction spermatique proprement dite de la fraction constituée des sécrétions des glandes annexes, n'est pas indispensable étant donné que la semence est constituée pour l'essentiel des sécrétions testiculaires.

Le conditionnement du sperme requiert quelques précautions telles que l'utilisation de récipients stériles, de produits chimiquement purs, d'eau distillée, l'absence de chocs thermiques et la mise du sperme à l'abri de l'air et de la lumière.

3.1. Les milieux de dilution

La dilution du sperme a pour but d'accroître le volume total de la masse spermatique, d'assurer un milieu favorable à la survie des spermatozoïdes *in vitro* et de réaliser à partir d'un seul éjaculat l'insémination d'un grand nombre de femelles.

3.1.1. Qualités des milieux de dilution

Les milieux de dilution doivent répondre à un certain nombre de conditions :

- ✓ Leur pression osmotique doit être isotonique avec le sperme pour l'espèce en cause et être capable de la maintenir pendant la durée de stockage.

- ✓ Ils doivent renfermer des substances colloïdales (jaune d'œuf, lipoprotéines, lécithines) susceptibles de protéger les spermatozoïdes.
- ✓ Les substances tampons permettent de maintenir un pH favorable aux spermatozoïdes (6.2 à 6.8). Leur présence est plus importante pour le sperme de taureau et de bélier que celui d'étalon et de verrat étant donné la concentration élevée en spermatozoïdes et donc la glycolyse élevée du sperme de ces deux espèces qui est responsable d'une diminution rapide du pH.
- ✓ Les substances nutritives sont sensées favoriser le métabolisme, la vitalité et la longévité des spermatozoïdes.
- ✓ Le milieu de dilution doit être dépourvu d'agents infectieux car ils sont préjudiciables à la survie des spermatozoïdes, à la fertilisation et au développement de l'embryon.

De ce fait, les spermatozoïdes se trouveront dans les meilleures conditions pour remplir leurs 4 fonctions préalables à la fécondation :

- a) Activité métabolique productrice d'énergie,
- b) Mobilité pour progresser dans les voies génitales femelles,
- c) Enzymes de protection sur l'acrosome pour en faciliter la pénétration dans l'ovocyte,
- d) Présence de protéines sur la membrane plasmique pour assurer leur survie optimale dans le tractus génital femelle et leur fixation sur la pellucide de l'ovocyte.

3.1.2. Nature des milieux de dilution

Il existe quelque soit l'espèce animale une grande variété de dilueurs. Ils se différencient par la nature voire la concentration d'utilisation de leurs composants.

On peut ainsi distinguer les dilueurs à base de **jaune d'œuf phosphaté** (Milieu de Lardy et Philips) ou **citrate** (Milieu de Salisbury), à bases de **sucres** (glucose, fructose : milieux de Kampschmidt, de Chominat, de Dimitropoulos, de Foote), à base de **glycocolle** et de **glycérol** (milieu de Roy), de CO₂ (milieu de Van Demark ou IVT : Illinois Variable Temperature) ou et plus classiquement maintenant à base de **lait** dont certains sont commercialisés (Laiciphos IMT).

Le lait peut être considéré comme un constituant de base apportant aux spermatozoïdes phosphates, citrates et sucres. Son pH est voisin de celui du sperme. Il est simple à préparer et peu cher. Le plus utilisé est préparé à partir de poudre de lait écrémé de vache additionné de cholestérol ou de lécithine, de sels, de glucose, d'acides aminés (glycocolle, tryptophane, tyrosine) et d'antibiotiques.

Le jaune d'œuf est habituellement utilisé à des concentrations comprises chez le taureau entre 5 et 15%. Il protège le sperme grâce aux lécithines qu'il renferme de l'effet néfaste des brusques variations de température. Source de nutriments, il agit aussi favorablement vis à vis des variations de pH et de pression osmotique.

Les antibiotiques s'opposent au développement des micro-organismes. Classiquement, la pénicilline et la streptomycine sont employées à la dose respectivement de 1000 UI et d'un mg par ml de dilueur. On se souviendra que certains antibiotiques peuvent être toxiques pour le spermatozoïde. Ainsi en est-il de l'oxytétracycline à la dose de 500 mcg/ml, de la chlorotétracycline à la dose de 50 mcg/ml. Dans l'espèce équine, la ticarcilline, l'amikacine la polymixine et la gentamycine ont également été recommandées.

L'emploi du glycérol (agent cryoprotecteur) n'est requis que si le sperme est destiné à être congelé. Le glycérol fixe une partie de l'eau du dilueur et ce faisant abaisse le point de congélation du milieu, diminue la quantité de glace à la congélation et à la décongélation et diminue la taille des cristaux. Il exerce par ailleurs un effet protecteur sur les membranes cellulaires et limite l'augmentation de la pression osmotique en réduisant la quantité d'eau qui se transforme en glace.

3.2.Le taux de dilution

Pour le taureau, son calcul est basé sur l'obtention de doses d'insémination renfermant une concentration en spermatozoïdes zootechniquement acceptable soit 10 à 12 millions de spermatozoïdes par paillette. Estimant à 40 % les pertes imputables aux processus de congélation-décongélation, il faut donc obtenir au terme de la dilution une concentration moyenne de 20 millions de spermatozoïdes par paillette de 0,25 ml. Cette valeur peut être revue à la baisse ou à la hausse en fonction de la qualité du sperme récolté.

IV. Conservation du sperme

4.1.Conservation à court terme

L'utilisation directe du sperme dilué de taureau suppose une conservation à une température voisine de 5°C. Celle-ci doit cependant pour éviter les chocs thermiques, être atteinte progressivement au rythme moyen de refroidissement de 0.5°C par minute entre 37 et 22°C et de 1°C par minute entre 22 et 5°C. Bien diluée et convenablement refroidie, la semence peut conserver son pouvoir de fécondation pendant 2 à 3 jours.

4.2. Conservation à long terme

La congélation du sperme de taureau : La congélation requiert l'utilisation d'agents cryoprotecteurs. Classiquement, le glycérol est utilisé pour congeler le sperme. Il est important de préciser qu'étant donné les effets délétères potentiels des agents cryoprotecteurs sur le spermatozoïde, ils doivent être utilisés à une dilution optimale. Ainsi, à la concentration de 4%, le glycérol offre la plus grande mobilité massale des spermatozoïdes du verrat mais c'est après congélation dans une solution à 1 % que les lésions de leurs acrosomes sont les moins nombreuses.

Deux solutions de dilueurs (Laiciphos 10 %, jaune d'œuf 10 %, eau distillée) sont requises. Elles se distinguent par le fait que la seconde renferme du glycérol à une concentration de 14 %. Le dilueur A est maintenu à 32°C et le dilueur B à 4°C.

4.2.1. Phase de refroidissement

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

4.2.2. Conditionnement

Une fois refroidi, le sperme sera conditionné le plus souvent en paillettes voire en ampoules de verre ou de plastique ou en pellets. Classiquement trois types de paillette sont utilisés. Elles ont toutes une longueur de 133 mm.

- La paillette grosse a un diamètre compris entre 3,8 et 4,2 mm et un volume de 1,2 ml.
- La paillette moyenne a un diamètre compris entre 2,5 et 2,8 mm et un volume de 0,5 ml.
- La paillette fine (la plus utilisée) a un diamètre compris entre 1,7 et 2,2 mm et un volume utile de 0,25 ml.

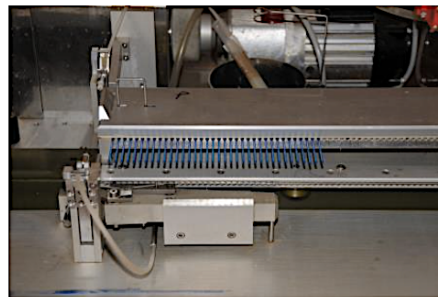
Ces paillettes sont constituées d'un cylindre de chlorure de polyvinyle dont une extrémité est obturée au moyen de deux étoupes de gaze entourant un bouchon de matière pulvérulente : l'alcool polyvinylique. Ce dispositif servira de piston lors de l'insémination. L'autre bout est libre et servira

au remplissage de la paillette. Les paillettes sont de couleurs différentes pour en faciliter l'identification. Celle-ci se trouve complétée par l'impression sur le corps de la paillette du nom du taureau, de son numéro d'identification, de la date de récolte et de l'identification du centre d'insémination.

Pour leur remplissage, une vingtaine de paillettes sont fixées à un peigne relié à une pompe d'aspiration. Une fois remplies, une légère agitation des paillettes permettra de ménager une place pour l'obturation et la bulle d'air nécessaire pour permettre la dilution du sperme lors de la congélation. Le bouchage s'effectue manuellement ou est plus souvent actuellement automatisée. Il est réalisé au moyen de poudre d'alcool polyvinylique qui une fois humide se transforme en gel ou par sertissage.



Le dilueur



Le remplissage des paillettes



Le bouchage des paillettes

Une fois le sperme conditionné, les paillettes sont plongées dans de l'eau à 4°C pour permettre l'action du glycérol (phase de glycerolisation) et des autres constituants du dilueur. Cette phase contribue également à rendre plus hermétique l'obturation de la paillette.

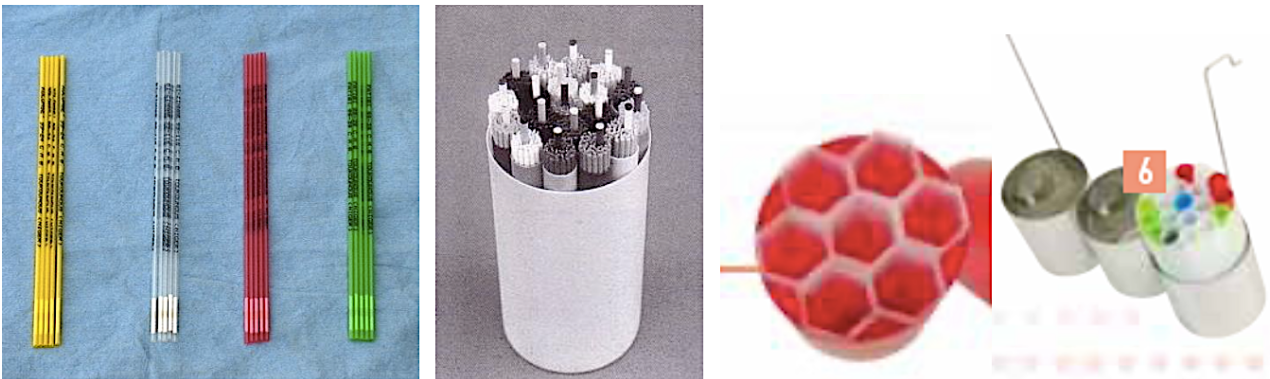
Les paillettes sont alors disposées sur une rampe de refroidissement en vue de leur congélation. Elles sont dans un premier temps disposées dans les vapeurs d'azote à quelques cm au-dessus du niveau d'azote liquide de la cuve. Le refroidissement est obtenu selon une courbe classique à savoir entre 4°C et -10°C un refroidissement de 4°C par minute et entre -10°C et -130°C un refroidissement de 40°C par minute. Biologiquement, la phase critique est celle comprise entre -10°C et -50°C. C'est entre ces températures en effet que se produisent les phénomènes de cristallisation extra puis intracellulaire et les mouvements d'ions qui en résultent.

Au bout de 7 à 9 minutes, la congélation est obtenue et les paillettes sont plongées dans l'azote liquide à -196°C. Il est intéressant de noter que ce type de congélation n'altère en rien le caractère pathogène de germes tels que *Brucella abortus*, *Campylobacter foetus*, *Actinomyces pyogenes* ou *Listeria monocytogenes*.



Machine pour la congélation automatique de la semence

Les paillettes sont stockées dans des visotubes, cylindres hexagonaux de couleur variable pour en faciliter le repérage, eux-mêmes placés dans des gobelets plus gros appelés canisters rangés dans des tanks pouvant contenir plusieurs centaines de litres.

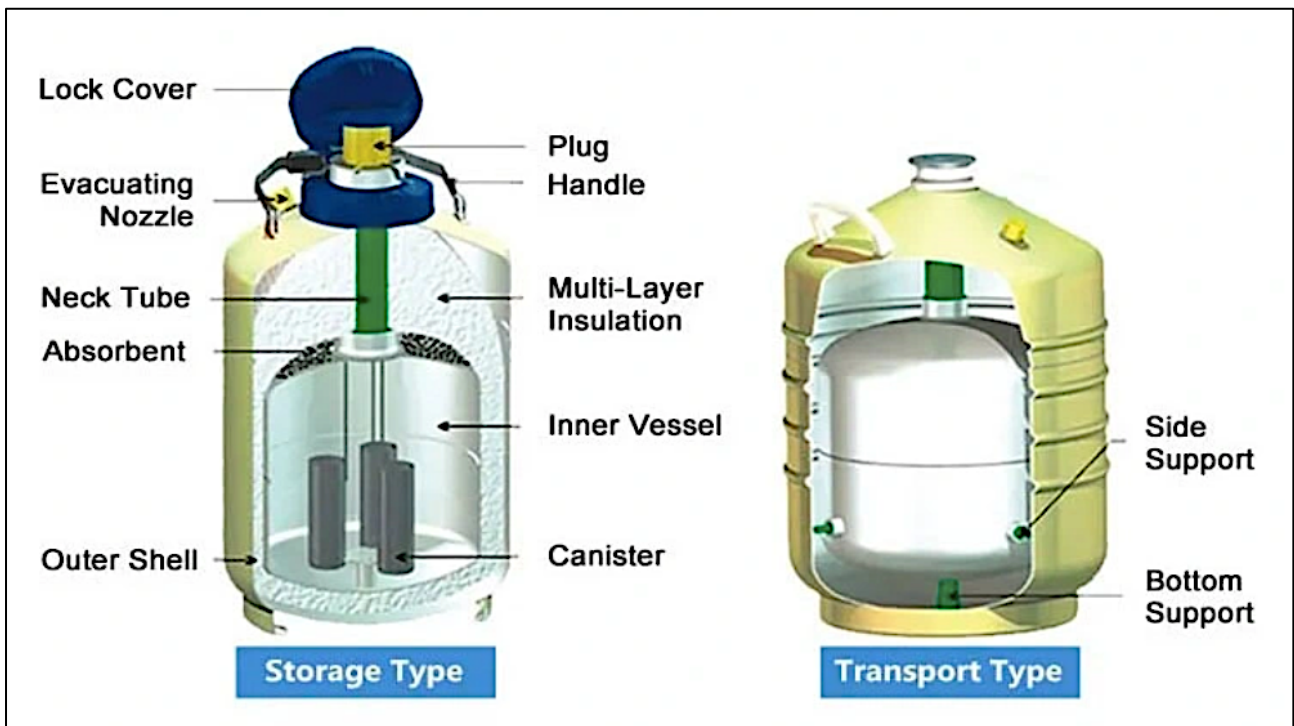


Les paillettes, les gobelets et les canisters pour leur stockage

Le transport des paillettes se fera dans des cuves d'azote (ou containers ou bonbonnes) dont il existe différents modèles de capacité et de propriétés thermiques différentes. Une vérification régulière du niveau d'azote de ces cuves s'impose. Par ailleurs, la température doit toujours y être inférieure à -120°C . Il est indispensable pour ce faire d'y maintenir un niveau minimal de 5 cm d'azote liquide. L'évaporation sera fonction de la fréquence d'ouverture de la cuve et du temps nécessaire au choix d'une paillette (5 à 8 secondes).



Les réservoirs pour l'azote liquide et les pailletes



Structure interne - cuve de stockage d'azote liquide

La semence conservée dans l'azote liquide peut être utilisée plus de vingt ans après sa préparation à condition que le niveau d'azote liquide dans les réservoirs soit toujours vérifié.

L'azote liquide est un gaz liquéfié, sans couleur ni odeur et sa température d'ébullition est de (-196°C). Cette basse température peut déterminer des lésions similaires aux brûlures.

Quand l'azote liquide s'évapore crée un gaz froid qui est plus lourd que l'air et qui se concentre dans le bas et produit une dense brume. Un litre d'azote liquide pèse 0,809 kg et il se transforme avec évaporation dans environ 700 litres de gaz. L'azote s'évapore plus ou moins rapidement selon le degré d'isolation des bonbonnes qui le contiennent.

Pendant sa propre évaporation, le gaz produit doit se libérer et donc les bonbonnes ne sont jamais à fermées étanches.

L'azote liquide n'est pas toxique mais il faut le manipuler avec précaution pour deux causes :

- Il peut déterminer des brûlures quand il touche la peau ;
- Dans une petite chambre enfermée il peut saturer l'air avec l'élimination de l'oxygène (danger d'asphyxie).

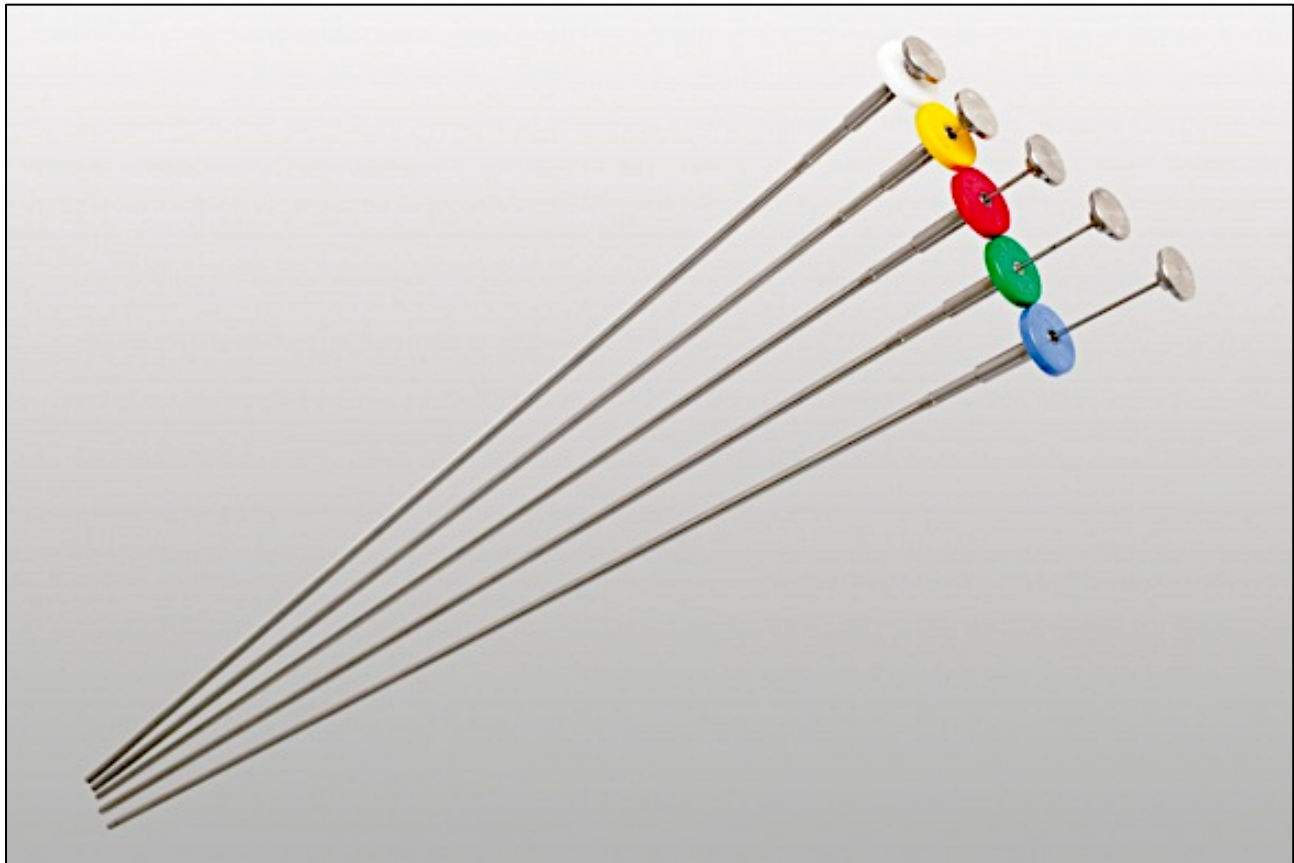
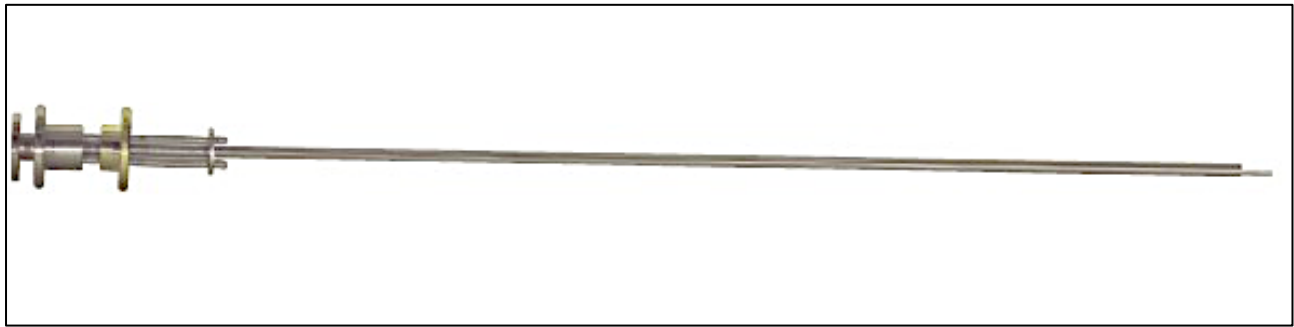
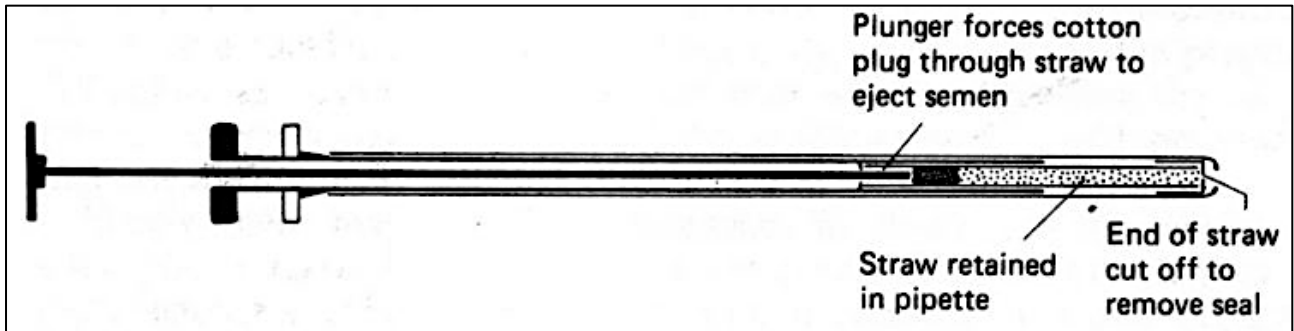
En cas de contact direct avec l'azote liquide il faut essayer de :

1. Réchauffer la partie endommagée en la plongeant dans de l'eau tiède ou avec la chaleur du corps mais pas la mettre en contact avec forte chaleur ;
2. Ne pas masser ou frotter la partie endommagée ;
3. Ne pas bouger si sont les pieds à être touchés ;
4. Laver avec un savon doux la partie endommagée ;
5. Demander l'avis d'un médecin en présence de grosses vessies ou ulcérations de la peau.

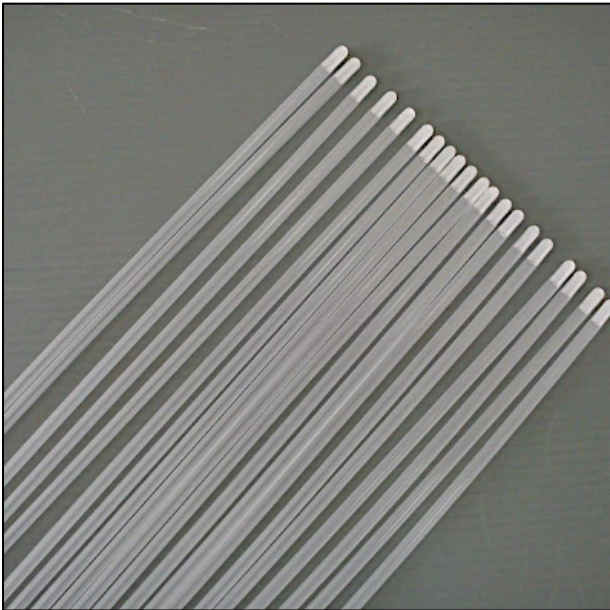
V. L'acte de l'insémination artificielle et la mise en place de la semence

Après avoir détecté la chaleur des animaux à inséminer ou après avoir suivi un protocole de synchronisation, il faut se préparer pour l'acte d'insémination et le matériel à utiliser pour la pratiquer.

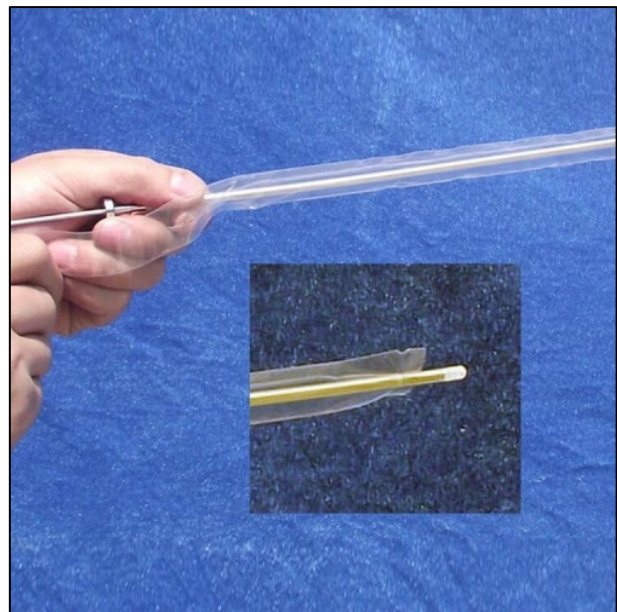
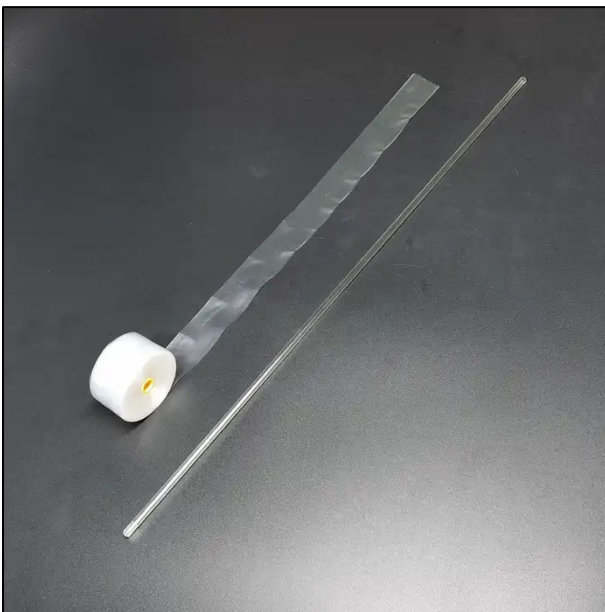
- **Le pistolet** : est une sorte de seringue longue 45 cm, réalisée en acier, avec un corps cylindrique, un piston et une rondelle pour fixer la gaine. Généralement on utilise des pistolets universels qui sont adaptés à l'usage soit des paillettes moyennes soit des paillettes mini. Après usage le pistolet doit être nettoyé avec alcool ou un autre désinfectant.



- **Les gaines** : sont à **usage unique** et assurent la protection sanitaire au pistolet pendant l'insémination. Elles doivent être conservées à l'abri de la lumière du soleil et de la chaleur excessive et dans un lieu propre et ne pas trop poussiéreux. Le sachet qui contient les gaines doit être ouvert du côté opposé à leurs pointes.



- **Les chemises sanitaires** : sont mises sur le pistolet et la gaine pour une ultérieure protection sanitaire au moment du passage dans le vagin et le col de l'utérus.



- **Le coupe-paillettes (ou ciseaux)** : est utilisé pour couper les paillettes du côté du bouchon.



- **Les gants** : sont utilisés pour protéger l'opérateur pendant la fouille rectale.
- **Le thermos** : est utilisé pour la décongélation des paillettes. Il doit garder la température de l'eau à environ 34 à 37°C.
- **Papier filtre** : est utilisé pour essuyer les paillettes après la décongélation.



5.1. La décongélation

Le réchauffement du sperme doit être aussi rapide que possible. Classiquement, la paillette sera tout d'abord secouée pour en faire tomber le reste d'azote liquide puis plongée et agitée dans de l'eau à 34-37°C (décongélation *in vitro*). La décongélation s'observe au bout d'une trentaine de secondes. Pendant ce temps, il est conseillé de frotter le pistolet d'insémination pour le réchauffer. Cependant, si la température ambiante est inférieure à 20°C, il est préférable de maintenir la paillette dans l'eau de réchauffement jusqu'à son utilisation pour éviter tout choc thermique au sperme. L'intervalle décongélation-insémination peut être prolongé jusque 60 minutes, si la paillette peut être maintenue à une température de 35°C.

Certains auteurs ont préconisé la décongélation dite *in vivo* c'est à dire dans le col utérin lors de l'insémination. Il semble bien en fait qu'en raison des 60 secondes en moyenne qui s'écoulent entre la charge de la paillette et l'insémination proprement dite, la décongélation s'opère en fait à la température du pistolet. En l'absence d'eau tiède, on peut également décongeler la paillette à la bouche.

Une fois décongelée secouée et essuyée (l'exposition du sperme à une goutte d'eau peut induire des lésions cellulaires irréversibles), la paillette est introduite dans le pistolet d'insémination par son extrémité comportant le double bouchon (rôle de piston). L'autre extrémité sera coupée perpendiculairement pour assurer un maximum d'étanchéité avec le bouchon de la gaine d'insémination. Idéalement, l'insémination de l'animal doit être réalisée dans les 15 minutes suivant la sortie de la paillette de l'azote liquide. Le pistolet et la gaine d'insémination seront éventuellement recouverts d'une gaine protectrice en plastique qui sera perforée lors de l'introduction du pistolet dans le col utérin.

5.2. L'insémination proprement dite

5.2.1. Espèce bovine

Le matériel se compose d'un pistolet d'insémination d'une longueur de 40 à 45 cm et d'un diamètre de 5 à 6mm comportant un corps externe et un mandrin interne. Il se complète d'une gaine en matière plastique externe fixée au pistolet d'insémination au moyen d'une petite rondelle. Deux méthodes d'insémination peuvent être utilisées chez les bovins.

La première ou voie vaginale repose sur l'emploi d'un spéculum et d'une source lumineuse permettant le dépôt du sperme dans la partie postérieure du canal cervical. Elle est pratiquement

abandonnée voire réservée à des cas individuels. La seconde ou voie rectale est classiquement utilisée parce que plus rapide et plus hygiénique mais aussi parce qu'elle offre la possibilité d'un examen préalable du tractus génital visant à confirmer l'état œstral de l'animal (présence de follicule, tonicité des cornes...) mais aussi favorable à la libération d'ocytocine et donc à la remontée des spermatozoïdes à la jonction utéro-tubaire. Le col est saisi manuellement au travers de la paroi rectale. Sa tension vers l'avant permet d'éviter la formation de replis vaginaux, susceptibles d'entraver la progression du pistolet d'insémination dans la cavité vaginale. L'introduction de l'extrémité du pistolet d'insémination dans le col peut être facilitée en plaçant le pouce dans l'ouverture postérieure du col tout en maintenant ce dernier au moyen de l'index et du majeur. La traversée du col sera facilitée en imprimant à ce dernier des mouvements latéraux et verticaux. Une fois le col franchi, le pistolet sera aisément le cas échéant guidé vers l'une ou l'autre corne.

Classiquement, le dépôt de la semence se fait au niveau du corps utérin. Les auteurs ne sont pas unanimes pour reconnaître le bénéfice d'une insémination dans une voire les deux cornes utérines. Quelque soit l'endroit anatomique d'insémination, il en résulte un reflux de sperme vers la cavité vaginale, celui-ci étant moindre si l'insémination a été réalisée au niveau du corps ou des cornes utérines que si elle a été faite au niveau du col.

Classiquement dans l'espèce bovine, l'insémination artificielle est réalisée 12 heures environ après le début des chaleurs. Elle obéit ce faisant à la règle classique AM/PM, PM/AM : chaleurs le matin, insémination le soir, chaleurs le soir, insémination le matin. Des modalités plus spécifiques peuvent être adoptées si l'insémination fait suite à un traitement hormonal.

a. Particularités anatomiques et physiologiques

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

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

Les espèces caprine et ovine sont essentiellement des espèces à activité sexuelle saisonnière le plus souvent élevées en troupeaux de grande taille et donc réparties en lots. L'insémination artificielle ne s'y pratique qu'une fois induites et synchronisées les chaleurs au moyen d'un progestagène (l'acétate

de fluorogestone employé chez la chèvre et la brebis), d'une prostaglandine (employée uniquement chez la chèvre) et d'une gonadotrophine, la PMSG.

b. Réalisation pratique de l'insémination

L'insémination suppose un minimum de contention individuelle manuelle ou au moyen de cornadis ou d'une salle de traite. Tout stress sera évité aux animaux. Un local d'attente sera prévu. La contention en position verticale de l'animal est de nature à faciliter l'intervention. Dans l'espèce caprine, un examen échographique préalable a été conseillé de manière à écarter les animaux présentant une pseudo-gestation.

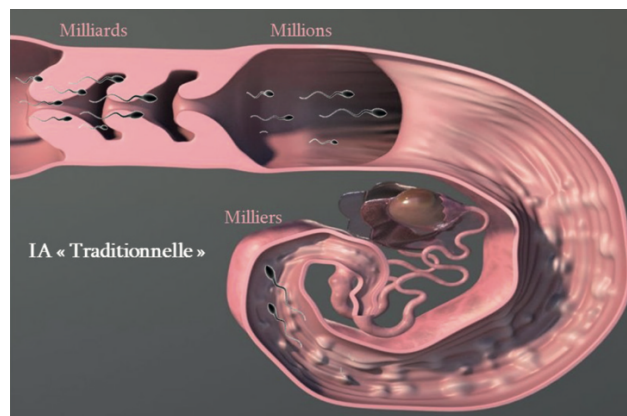
Chez la brebis, la semence est conservée non congelée et conditionnée en paillettes de 0.2 ml renfermant 400 millions de spermatozoïdes. La durée de conservation à + 15°C n'excède jamais 10 heures. L'insémination est réalisée en une seule intervention 55 heures après le retrait de l'éponge pour les adultes et 52 heures après pour les agnelles. Chez la chèvre, les semences sont également conditionnées en paillettes de 0.2 ml contenant 100 millions de spermatozoïdes. Une seule insémination est réalisée 43 heures environ après le retrait de l'éponge pour les chèvres alpines et 45 heures plus tard pour les chèvres Saanen. Plus rarement, l'insémination est effectuée sur œstrus observé 24 heures après son début.

Une fois sortie du réservoir d'azote liquide, la paillette congelée est plongée dans de l'eau à 37°C pendant 15 secondes puis essuyée et introduite dans le pistolet d'insémination préalablement réchauffé. L'extrémité de la paillette est coupée et recouverte d'une gaine protectrice puis bloquée avec un anneau. La paillette de semence fraîche est plongée dans de l'eau à 4°C (chèvre) ou à 15°C (brebis).

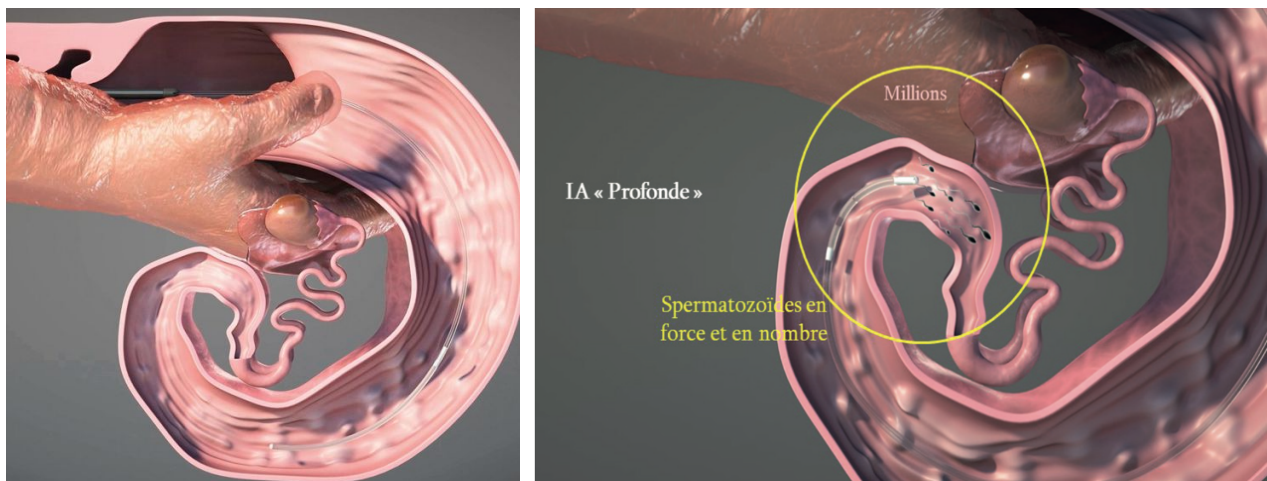
L'arrière-train de l'animal est soulevé et la vulve au besoin nettoyée. Le spéculum est introduit et le col de couleur rose ou rouge repéré sur le plancher du vagin. L'extrémité du pistolet est guidée vers le col dans lequel il est introduit le plus loin possible par des mouvements de rotation. Le sperme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

L'insémination intra-utérine par endoscopie est surtout utilisée chez les ovins. Elle offre le double avantage d'augmenter la fertilité lors d'utilisation de sperme congelé et d'utiliser beaucoup moins de spermatozoïdes (environ 10 fois moins que pour une insémination exocervicale). Pour ce faire, une

mise à jeun préalable de 12 heures est nécessaire. L'animal est placé en décubitus dorsal et ses 4 membres immobilisés. Après anesthésie locale, deux ouvertures sont pratiquées dans la paroi de l'abdomen au moyen d'un trocard. Le sperme est déposé (volume d'une demi-paillette) au moyen d'un pistolet spécial appelé transcap au sommet de chaque corne utérine. La technique est lourde et ne permet d'inséminer moyennant un entraînement spécial que 25 brebis à l'heure.



Saillie naturelle / IA traditionnelle (lieu de dépôt : vagin)



IA Profonde

Envoyez vos questions, remarques et suggestions à : ✉ said.boukhechem@umc.edu.dz

Le document PDF est téléchargeable sur : La plateforme MOODLE de l'université des frères MENTOURI :
<http://elearn.umc.edu.dz:25000>

© Institut des Sciences Vétérinaires, Université Constantine 1 – Avril 2024.