

**REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE**

**UNIVERSITE IBN KHALDOUN DE TIARET
INSTITUT DES SCIENCES VETERINAIRES
DEPARTEMENT DE SANTE ANIMALE**

**PROJET DE FIN D'ETUDES EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE
DOCTEUR VETERINAIRE**

SOUS LE THEME

**ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE SUR LA CONSERVATION DE LA SEMENCE DU
BOUC**

PRESENTE PAR:

SAFRI HANANE

ENCADREE PAR:

MR. BELHAMITI. T.B.



REMERCIEMENTS

Avant tout nous remercions Dieu tout puissant de nous avoir accordé la force, le courage et les moyens afin de pouvoir accomplir ce modeste travail.

Ce travail n'aurait jamais pu être mené à son terme sans l'aide combien inestimable de ceux qui ont bien voulu nous conseiller et nous supporter. Aujourd'hui, il nous est très agréable de les remercier ici.

Un grand merci à Monsieur BELHAMITI T. B. maître d'assistant à ISV Tiaret, pour nous avoir proposé ce sujet, et nous avoir dirigé et conseillé tout au long de sa réalisation. Non seulement pour l'honneur qu'il nous a fait d'avoir accepté d'être notre promoteur.

Un grand merci à tous mes enseignants de l'ISV.

Un beau remerciement à mes consœurs ; CHAFIA et FATIMA pour leurs aide à réaliser ce mémoire.

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail

*Aux deux personnes les plus tendres au monde
Que j'ai eu la chance de*

*Les avoir comme parents, je vous remercié de tout
Mon cœur pour vos*

Efforts et votre aide afin d'élaborer ce mémoire

J'espère que ce travail puisse refléter l'image de vos sacrifiés

Que dieu vous protège et vous garde

A mes très chers frères ;Nacer, Zaki, Mohamed ,Sid Ahmed et Anes

A mes meilleurs amis :Chafia, Fatima et Asia

Abd Allah et Abd Neur

Et à tous mes collègues de promotion 5ème année

Toujours été auprès de moi dans le meilleur comme

Dans la pire

Merci pour tout le gain que vous aviez donné

A tous ceux qui ont réussi à gagner une place de mon cœur

Liste des abréviations

Liste des tableaux

Liste des figures

Introduction

Chapitre 1 : Généralités	1
1. Identité des caprins.....	1
1.1. Classification de l'espèce:.....	1
2. Origine descaprins.....	1
3. Historique de l'IA	2
4. Avantage et inconvénient.....	2
5. Conservation du sperme.....	2
5.1. A court terme par refroidissement.....	2
5.2 -Phase de refroidissement et de dilution du glycérol.....	3
6. Contrôle de la semence du bouc	3
6.1-Volume de l'éjaculat.....	3
6.2-Concentration de l'éjaculat.....	3
6.3-Motilité massale.....	7
6.4-Pourcentage de spermatozoïdes mobiles.....	7
6.5. Motilité individuelle des spermatozoïdes.....	8
6.6. Mesure du pourcentage de spermatozoïdes vivants et des anomalies spermatiques.	8
6.7-Préparation du colorant.....	10
6.7-Coloration de la semence et préparation des lames.....	10
6.8-Méthode de comptage des différentes classes de spermatozoïdes.....	11
6.9-Tests de thermo résistance.....	12

Table des matières

6.10-Autres tests de qualité de la semence.....	12
7. Préparation des paillettes d'IA	12
7.1-Préparation des dilueurs	12
7.2-Conditionnement en paillettes	13
8. Conservation à l'état congelé.....	13
8.1-Dilution de l'éjaculat.....	14
8.2-Congélation en paillettes.....	14
9. Espèce caprine.....	15
9.1-Lavage de la semence de bouc.....	14
9.2-Utilisation sous forme congelée	18

% : Pourcentage

[] : Concentration

€ : Euro

> : Supérieur

°C ; Degré Celsius

CaCl₂ : Chlorure de calcium

G : Gramme

Fao : Food and Agriculture Organization of the United Nations

H : heure

HCl : acide chlore hydrique

HCl/N

HCl/Nb :

IA : Insémination artificielle

KCl : Chlorure de potassium

K₂ PO₄ : Permanganate de potassium

MgSO₄, 7H₂O : Sulfate de potassium

Min : Minute

ml : Millilitre

mm : Millimètre

NaCl : Chlorure de sodium

GOT : glutamique oxaloacétique transaminase

Sec : Seconde

Spz : Spermatozoïde

T° : Température

UI : Unité Internationale

μ ; Microunité

Liste des tableaux

Tableau 1 : Evolution du cheptel (milliers de têtes) en l'Algérie	1
Tableau 2 Détermination de la note de motilité individuelle des spermatozoïdes	7
Tableau 3 : Préparation du colorant pour examen de viabilité des spermatozoïdes	10
Tableau4 : préparation de dilueur	12
Tableau5 : Résumé des différentes étapes de lavage et de traitement de la semence de bouc utilisation pour sous forme liquide ou congelée	16
Tableau 6 : Préparation de la solution de lavage pour le sperme de bouc (solution Krebs-Ringer-phosphate-glucose à préparer la veille de la collecte)	17
Tableau 7 : Préparation des dilueurs pour la semence de bouc (à préparer la veille de la collecte)	18

Liste Des Figures

FIGURE 1 Hématimètre pour compter les spermatozoïdes: mise en place de la lamelle

FIGURE 2 Comptage des spermatozoïdes dans un hématimètre

FIGURE 3 Préparation des frottis de semence colorés: (a)mélange des gouttes (b) étalement du mélange (c)étalement du mélange

FIGURE 4 Préparation de la semence en paillettes: (a) matériel (paillettes, portoirs et récipient) (b) remplissage des paillettes pour l'azote liquide) (c) bouchage des paillette avec l'alcool (d) mise en place des paillettes sur les polyvinylique coloré portoirs pour la congélation

Introduction

Depuis l'apparition des techniques de cryoconservation de la semence, il y a plus de 50 ans, la compréhension des mécanismes d'actions impliqués dans ce processus de conservation des cellules germinales s'est grandement améliorée, notamment par les nombreuses recherches effectuées sur le modèle bovin.

La cryoconservation de la semence permet l'accès à une semence de qualité tout au long de l'année, ce qui facilite la pratique de l'IA en contre-saison chez la chèvre. L'apprentissage des techniques de cryoconservation de la semence s'allie aux outils d'amélioration génétique et d'augmentation de la production laitière des troupeaux caprins.

Or les paillettes sont des moyens pour l'amélioration de la reproduction et donc la reproduction des caprins. Cela conduit à se demander comment faire la conservation des paillettes. La pertinence de cette problématique s'est d'ailleurs confirmée au cours des travaux préparatoires de la présente étude.

L'exploitation de ces sources devait permettre de répondre à une série d'interrogations inhérentes au sujet : quelle sont les conditions de l'utilisation des paillettes? Comment faire le stockage des paillettes? Comment faire le contrôle des paillettes. Intitulé La conservation des paillettes d'insémination artificielle d'espèce caprine, ce mémoire tend ainsi à démontrer que les moyens pour conserver la semence sont différents comme les paillettes.

1. Identité des caprins

1.1. Classification de l'espèce: Selon Holmes-pegler (1966), Babo (2000) et Fournier (2006), la chèvre domestique dont le nom scientifique *Capra hircus* appartient à:

Règne: Animal

Embranchement: Vertébrés

Classe: Mammifères

Sous- classe: Placentaires

Ordre: Artiodactyles

Sous-ordre: Ruminants

Famille: Bovidés

Sous-famille: Caprinés

Genre : *Capra*

2. Origine des caprins :

Selon GEOFFROY.H. (1919) et MAMET .R. (1971), les chèvres indigènes de l'Afrique du nord sont originaires de NUBIE.

Plusieurs auteurs Epstein (1971), Esperandieu.H. (1975), Mason (1984), Lauvergne (1988) et Vigne (1988) affirment que l'ancêtre de la chèvre domestique est une « chèvre sauvage du Proche-Orient», ***Capra hircus aegagrus***, qu'on retrouvait en Asie antérieure et en Afrique Orientale, et qui inaugure la série de chèvres domestiques groupées sous le nom de ***Capra hircus***.

La chèvre sauvage à Bézoard du sud-ouest asiatique pouvait être considérée comme l'ancêtre de la plupart des chèvres domestiques. Tandis que la chèvre Ibex Abyssin se trouve, de même associé avec la chèvre à Bézoard, dans l'ascendance de nombreuses chèvres du nord et de l'est de l'Afrique (French, 1971).

Tableau 1. Evolution du cheptel caprin (milliers de têtes) en l'Algérie (FAO, 2012)

Années	1990	1995	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2010
Caprins	2 472	2 780	3 062	3 027	3 129	3 281	3 325	3 451	3 590	3 800

3-Historique de l'IA :

Les arabes utilisaient, au 14^{ème} siècle, l'IA chez la jument et ce grâce à ABOU BAKR ENNACIRI, mais c'est seulement à la fin du 18^{ème} siècle que les premières inséminations des mammifère ont été rapportées (Haskouri, 2001).

En 1719, le physiologiste italien Lauro Spallanzani injecta du sperme dans le vagin d'une chienne en chaleur, laquelle accoucha de 3chiots 62j plus tard. Un siècle après, Albrecht, Millaiset et Repiquet reproduisirent la même méthode.

La mise au point, au début du 20^{ème} siècle, du vagin artificiel par Ivanov et ses collaborateurs, et en 1952 de la congélation du sperme par Poldge et Rowson, a permis à l'IA de prendre son réel essor (Yahimi, 2003).

4-Avantages et inconvénients;

4.1Importance génétique

- _ Diffusion de la semence
- _ Taureaux élites (100/980 taureaux testés)
- _ Augmentation de la production de lait, de viande

4.2 Importance sanitaire

- _ Éradication de maladies
- _ Contrôle sanitaire des taureaux
- _ Hygiène de la récolte
- _ Aucun contact avec l'extérieur

4.3 Importance économique

- _ Coût de l'entretien d'un taureau
- _ IA + 2 retours » 50 € : meilleurs géniteurs

4.4 Inconvénient:

- _ Risque de réduction du potentiel génétique
- _ Risque de diffusion d'anomalies génétiques (Hanzen, 2009).

5. Conservation du sperme

5.1. A court terme par refroidissement

- _ Taureau : à 5°C pendant 2 à 3 jours
- _ Passage progressif de 37°C à 5°C

. Long terme par congélation

5.2 -Phase de refroidissement et de dilution du glycérol

-Phase de conditionnement

- ampoules de verre ou de plastique

- paillettes :

1– 133 mm de long

2– volume de 1.2 ml : grosse paillette

3– volume de 0.5 ml : paillette moyenne

4– volume de 0.25 ml : mini paillette (10 à 12 millions de spz)

5- Couleur et identification

-Phase de congélation: vapeur d 'N pendant quelques min puis dans l 'NLiquide

6. Contrôle de la semence du bouc ;

6-1-Volume de l'éjaculat

La mesure du volume de l'éjaculat s'effectue par lecture directe à l'aide graduations du tube de collecte. La lecture se fait sans tenir compte de la partie mousseuse de l'éjaculat. Le volume moyen de l'éjaculat est d'environ 1 à 1,5 ml dans les deux espèces mais varie d'un éjaculat à l'autre.

6-2-Concentration de l'éjaculat

L'objectif de cette mesure est de pouvoir déterminer le nombre des spermatozoïdes par millilitre de semence pure en utilisant le minimum de semence possible. La concentration spermatique varie généralement de 2 à 10×10^9 spermatozoïdes par millilitre de semence éjaculée. Plusieurs possibilités existent pour mesurer cette concentration: appréciation visuelle directe de la consistance de l'éjaculat comptage exact avec un hématimètre mesure de la densité optique dans un spectrophotomètre.

L'appréciation visuelle directe de la concentration spermatique est une technique utilisée par plusieurs centres d'IA. Cette pratique n'est toutefois pas recommandée en raison de son assez grande imprécision due à l'appréciation subjective et parce que d'autres techniques précises et d'emploi facile peuvent être utilisées.

Le comptage exact du nombre de spermatozoïdes dans un hématimètre est une technique précise si elle est effectuée soigneusement. Le principe de lame sure est le comptage du nombre exact de cellules spermatiques présentes dans un volume déterminé d'une solution de dilution connue.

Une cellule de Malassez est une lame spéciale quadrillée qui permet le comptage de différents types de cellules

Les différentes étapes à suivre pour un comptage à l'hématimètre sont les suivantes:

1. Prélever (précisément) 0,01 ml de semence pure et la diluer dans 4 ml (précisément) de sérum physiologique formolé (0,9 pour cent de chlorure de sodium; 0,1 pour cent de formaldéhyde dans de l'eau distillée), puis homogénéiser la solution. (*Baril et al. 1993*)

2. Préparer l'hématimètre en pressant fortement la lamelle sur les côtés de la grille, après avoir nettoyé et séché soigneusement les surfaces (*Baril et al. 1993*) concernées. Cette manipulation permet de faire adhérer la lamelle à l'hématimètre (figure 1).



Figure1 : Hématimètre pour compter les spermatozoïdes: mise en place de la lamelle.

3. Avec une pipette Pasteur, rincée au préalable avec la solution contenant les spermatozoïdes, déposer une petite goutte de solution sans bulle d'air, en bordure de la lamelle. La gouttelette, par capillarité, se répartit alors entre lame et lamelle.

4. Laisser reposer quelques minutes afin que les spermatozoïdes se déposent sur le fond de la lame. (*Baril et al. 1993*)

5. Placer avec soin l'hématimètre (veiller à le maintenir horizontal) sur la platine du microscope (équipée d'un mécanisme de précision permettant le déplacement dans deux directions), sous contraste de phase avec un grossissement de 200. Le champ du microscope couvre généralement la surface d'un grand carré. (*Baril et al. 1993*)

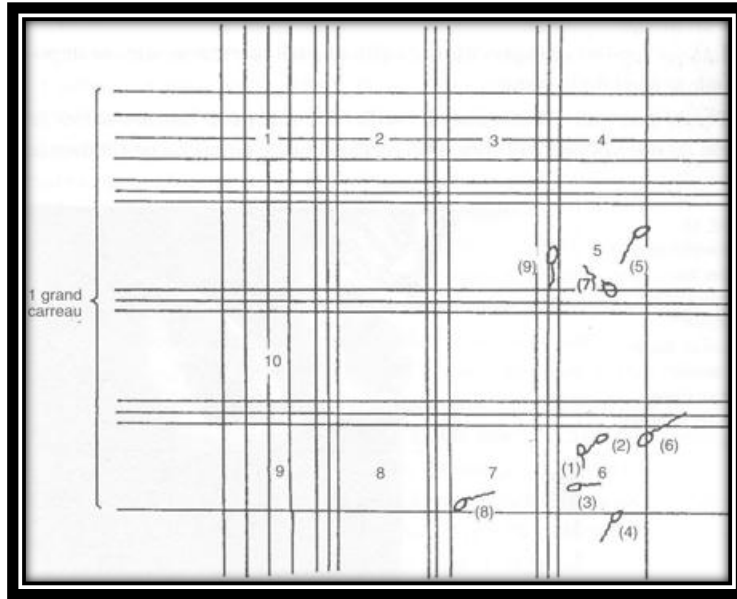


Figure 2 Comptage des spermatozoïdes dans un hématimètre

(Baril et al. 1993)

6. Compter au moins 10 grands carreaux par grille et trois à quatre grilles par éjaculat. Pour le comptage des spermatozoïdes, les règles suivantes peuvent être adoptées (figure 2): les spermatozoïdes nos 1, 2, 3, 8, et 9 sont comptés dans le carreau; les spermatozoïdes n° 4 et 6 («entrants») sont comptés, leur tête touche ou croise une ligne extérieure du carreau; les spermatozoïdes n° 5 et 7 («sortants») ne sont pas comptés, parce que leur tête est en dehors des lignes extérieures du carreau. Si un comptage diffère de la moyenne par plus de 10 pour cent, il est nécessaire de recommencer le comptage. Ne pas omettre de faire varier la mise au point à chaque lecture pour repérer les spermatozoïdes éventuellement restés en suspension ou collés sous la lamelle.

-La cellule de Malassez

La cellule de Malassez possède un quadrillage spécifique comportant 100 rectangles : Parmi les 100 rectangles totaux, on trouve 25 rectangles qui sont divisés en 20 petits carrés afin de faciliter le comptage.

→ Le volume correspondant au quadrillage total est égal à $1 \text{ mm}^3 = 10^{-6} \text{ dm}^3$

→ Chaque rectangle correspond à un volume 100 fois plus faible, soit $0,01 \text{ mm}^3 = 10^{-8} \text{ dm}^3$

-Remplissage de la cellule de numération

- Humecter les deux plateaux latéraux. Faire adhérer parfaitement la lamelle aux plateaux latéraux : pour cela placer la lamelle sur ces plateaux, puis à l'aide des pouces posés

sur la lamelle, exercer une pression sur la lamelle tout en pratiquant un mouvement de va et vient jusqu'à perception d'une résistance.

- Placer la cellule de comptage sur une surface plane. Homogénéiser la suspension cellulaire, et prélever celle-ci à l'aide d'une pipette Pasteur. Remplir la chambre de comptage par capillarité, en plaçant la pointe de la pipette légèrement inclinée près de la lamelle sur la plate

- Après utilisation, la lame porte-objet et la lamelle planée sont immergés dans un bain d'eau de Javel pendant 5 minutes, puis sont rincées avec de l'eau distillée et essuyées avec du papier.

-Numération

- Observer à l'objectif **x10** pour repérer la position du quadrillage, et vérifier l'homogénéité de la répartition des cellules à compter (si la répartition est mauvaise, recommencer).

- Observer ensuite à l'objectif **x40** pour réaliser le comptage (1 rectangle par champ).

- Compter les cellules contenues dans 4, 10, 20 ou dans la totalité des 100 rectangles du quadrillage. Remarque : pour les cellules chevauchant les lignes de quadrillage, compter seulement celles qui chevauchent 2 arêtes du rectangle sur 4 (en pratique, on choisit de prendre en compte les cellules chevauchant la ligne horizontale supérieure, et la ligne verticale droite). É horizontalement

-Calcul de la concentration cellulaire

Après avoir effectué la manipulation, on calcule la concentration cellulaire de la suspension de cellules étudiée.

Soient : -n : nombre de cellules comptées.

-V : volume de comptage.

-f : facteur de dilution.

-N : nombre de cellules par litres.

Si on a n cellules dans V litres, alors on a N cellules dans un litre :

$$N \times V = n \times 1 \quad N = n / V$$

Si la solution avait été diluée : $N = (n / V) \times f$

Cette technique est la plus précise pour la détermination de la concentration spermatique. Elle requiert toutefois du temps et de la patience et ne peut donc pas être mise en œuvre dans les conditions de routine d'un centre d'IA.

L'utilisation d'un spectrophotomètre est la technique la plus efficace car elle allie rapidité et précision. Le principe général est de mesurer la densité optique (à une longueur d'ondes de 550 nm) de la solution saline formolée précédente, contenant les spermatozoïdes, et de la comparer à un blanc (ne contenant pas de spermatozoïdes). Avant d'utiliser cette technique dans des conditions de routine, il est nécessaire d'obtenir une courbe standard en utilisant 20 à 50 échantillons de concentrations différentes et connues en spermatozoïdes, déterminées au préalable à l'aide de l'hématimètre. Chaque année une vérification (comparant les comptages à l'hématimètre et la densité optique) doit être faite pour prévenir toute dérive de l'instrument de mesure.

Tableau 1 : Détermination de la note de motilité massale de la semence (*Baril et al. 1993*)

note	Aspects du mouvement
0	Immobilité totale
1	Mouvements individualisés
2	Mouvements très lents
3	Motilité massale générale de faible amplitude
4	Motilité massale rapide, sans tourbillons
5	Motilité massale rapide, avec tourbillons

6.3-Motilité massale

C'est une mesure rapide et facile qui nécessite un examen microscopique de la semence, dès que celle-ci est collectée. Une goutte de sperme pur est déposée sur une lame et placée sur la platine chauffante du microscope (37-38°C) sous un grossissement de 80. L'observation doit être faite très rapidement car la motilité massale du sperme pur, à cette température, diminue rapidement au bout de 15 à 20 secs. La mesure est faite en utilisant une échelle qui va de 0 (aucun mouvement) à cinq (mouvements forts), ainsi que cela est défini au tableau 10. Un entraînement est nécessaire avant d'aboutir à une mesure fiable de routine.

Cette technique est suffisamment efficace pour détecter les éjaculats où les spermatozoïdes sont morts ou sont très peu mobiles; elle est toutefois trop imprécise pour différencier les éjaculats avec différents pourcentages de spermatozoïdes mobiles ou

différentes motilités individuelles. Ce test peut être utilisé pour des mâles non préalablement sélectionnés.

Tableau 2 : Détermination de la note de motilité individuelle des spermatozoïdes (*Baril et al. 1993*)

Note	Motilité individuelle
0	Pas de déplacement des spermatozoïdes
1	Déplacement très lent ou pas de déplacement tremblements du spermatozoïde, oscillations de la queue
2	Déplacement lent, tremblements, mouvements inorganisés, quelques spermatozoïdes se déplacent plus rapidement
3	Les spermatozoïdes effectuent des déplacements curvilinéaires sans tremblement
4	Déplacement rapide, quelques cellules avec une trajectoire rectiligne, d'autres avec une trajectoire courbe
5	Déplacement rectiligne et rapide des spermatozoïdes

6-4-Pourcentage de spermatozoïdes mobiles

Cette mesure est réalisée en déposant une goutte de semence diluée entre la lame et la lamelle et en l'examinant au microscope. Le grossissement est d'environ 200 et la platine chauffante est à 37-38°C. La dilution de la semence pour une observation correcte doit être comprise entre 60 et 200 x 10⁶ spermatozoïdes/ml. L'observateur décide, après l'examen successif de cinq champs d'une même préparation, d'une estimation visuelle du pourcentage de spermatozoïdes mobiles. Pour un observateur entraîné, cette mesure est assez répétable. Pour l'apprentissage et l'entraînement régulier, il est nécessaire de comparer cette estimation visuelle du pourcentage de spermatozoïdes mobiles avec le pourcentage exact de spermatozoïdes vivants donné (*Baril et al. 1993*).

Par le test de coloration différentielle éosine/ nigrosine. Pour un opérateur entraîné, la corrélation entre ces deux déterminations est généralement élevée (>0,90).

6.5. Motilité individuelle des spermatozoïdes

L'estimation visuelle de la motilité individuelle des spermatozoïdes est réalisée en même temps que l'estimation précédente du pourcentage de spermatozoïdes mobiles. Par conséquent, elle est effectuée dans les mêmes conditions de température et de grossissement.

La mesure est réalisée en utilisant une échelle allant de 0 (aucun mouvement des spermatozoïdes) à 5 (spermatozoïdes «fléchant» avec un mouvement rectiligne). Cette estimation doit tenir compte de la vitesse de déplacement des spermatozoïdes, de la rectitude de celui-ci et de ses mouvements latéraux, comme il est indiqué au tableau 2. Un entraînement est également nécessaire mais, pour le moment, aucune méthode objective ne permet d'apporter des corrections. L'entraînement peut se faire en observant, dans différents échantillons, la diminution de la motilité au cours de tests de thermo résistance (*Baril et al. 1993*)

Les deux tests précédents sont suffisamment précis pour juger ou non si les éjaculats doivent être écartés sur la base de faibles pourcentages de spermatozoïdes mobiles ou de faible motilité. Ils sont généralement utilisés pour apprécier la qualité de la semence après congélation et dégel (*Baril et al. 1993*)

Toutefois, même s'ils sont liés à la fertilité de la semence, ils sont incapables de la prédire avec précision; d'autres tests sont donc nécessaires.

6.6. Mesure du pourcentage de spermatozoïdes vivants et des anomalies spermatiques

Ce test, qui utilise un colorant éosine/nigrosine, est efficace pour déterminer le pourcentage exact de spermatozoïdes morts et celui de spermatozoïdes anormaux. Ainsi, le pourcentage de spermatozoïdes anormaux peut changer avec la saison (ou la photopériode) chez le bélier, et avec les températures ambiantes élevées chez le bélier et le bouc. Par conséquent, si aucun effet néfaste des températures élevées n'est soupçonné (dans les climats tempérés par exemple), cette mesure est d'un intérêt limité chez le bouc, puisque aucune apparition de spermatozoïdes anormaux due à la photopériode n'existe dans cette espèce.

Chez le bélier, cette période de collecte fréquente de semence peut coïncider avec la fréquence maximale d'anomalies spermatiques (printemps pour les races saisonnées). Pour une bonne connaissance de la qualité de la semence, il est utile de déterminer le pourcentage de spermatozoïdes anormaux dans des échantillons de semence à deux semaines d'intervalle.

La semence des reproducteurs potentiels ne doit pas contenir plus de 20 à 30 pour cent de spermatozoïdes morts (colorés) et pas plus de 15 à 20 pour cent de spermatozoïdes anormaux, dans le premier éjaculat d'une série.

6.7-Préparation du colorant

Le colorant est composé de la manière suivante: après l'obtention d'une solution homogène, laisser reposer 24 h, puis filtrer. Mesurer le pH de la solution et ajuster à environ 6,7-6,8, si nécessaire avec une solution d'acide citrique concentrée. La pression osmotique de la solution est d'environ 310 millions moles. La solution peut être conservée à +4°C, le pH étant contrôlé mensuellement. (*Baril et al. 1993*)

Tableau 3 : Préparation du colorant pour examen de viabilité des spermatozoïdes
(Baril et al.,1993)

Eosine (soluble dans l'eau)	1g
Nigrosine (soluble dans l'eau)	2g
Tri-Citrate de sodium, 5,5 H ₂ O	3,57 g
Eau distillée	100 ml

6.7-Coloration de la semence et préparation des lames

Utiliser une lame correctement nettoyée et séchée sur une platine chauffante à +30°C. Sur la partie gauche de la lame, déposer trois gouttes de 10 µl de colorant.

Ajouter une goutte de semence diluée (dilution 1 volume semence + 4 volumes dilueur; voir ci-après pour la composition des dilueurs) et mélanger avec le colorant pendant 10 secondes.

Laisser reposer le mélange pendant 50 secondes. Etaler alors le mélange colorant + semence à l'aide d'une lamelle en un film aussi fin et régulier que possible (figure 3). Identifier la lame avec le numéro du mâle et de l'éjaculat.

Conserver la préparation à sec dans une enceinte sèche (étuve à 30°C) ou dans une boîte à lame en plastique fermée et étanche, elle-même placée dans un sac en plastique scellé. Dans ces conditions, la préparation peut être conservée durant plusieurs mois sans altération.

6.8-Méthode de comptage des différentes classes de spermatozoïdes.

Placer la lame sur la platine chauffante du microscope (37-38°C pour éviter l'hydratation) et examiner, à la lumière directe, différents champs de la même préparation,

jusqu'à un total d'au moins 150 spermatozoïdes. Cette procédure doit être répétée au moins une fois pour obtenir une mesure précise. Il est nécessaire de distinguer:

Les spermatozoïdes colorés: tout spermatozoïde coloré, en totalité ou en partie, en rose ou en rouge, est considéré comme mort au moment de la coloration. Ce nombre est utilisé pour le calcul du pourcentage de spermatozoïdes morts/vivants.

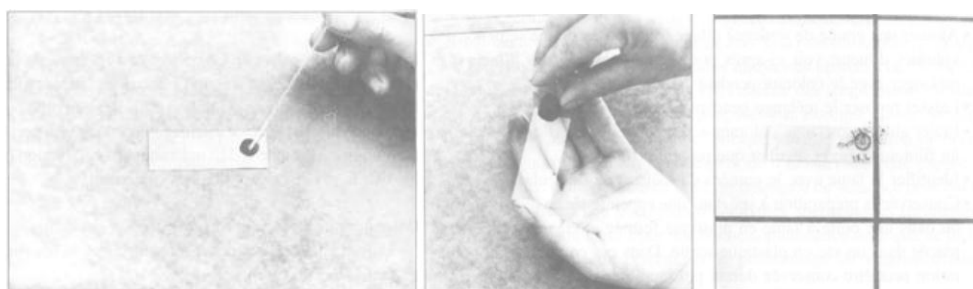


Figure 3 : Préparation des frottis de semence colorés: (a) mélange des gouttes (b) étalement du mélange (c) étalement du mélange (*Baril et al. 1993*)

6.9-Tests de thermo résistance

Les spermatozoïdes ont besoin de plusieurs heures après l'éjaculation ou après l'IA pour atteindre le lieu de fécondation chez la femelle. Leur pouvoir fécondant est, par conséquent, en partie lié à leur aptitude à survivre dans le tractus génital femelle. Cette observation a conduit à l'utilisation de tests de thermo résistance (à la température corporelle de la femelle), *in vitro*, pour apprécier la survie des spermatozoïdes. Les conditions d'incubation varient avec les espèces et avec le type de semence à tester (fraîche, congelée), mais dans les deux espèces, la semence est généralement ré diluée (dans le milieu utilisé pour la dilution finale de la semence) à une concentration comprise entre 80 et 300 x 10⁶ spermatozoïdes par millilitre, et placée dans un bain-marie à 37-38°C. Le taux de pourcentage de cellules vivantes et de la motilité peut être calculé au début du test et deux ou trois heures après, voire plus longtemps.

Pour l'IA avec la semence congelée chez la brebis, celle-ci peut être ré diluée dans une solution hypotonique (250 milliosmoles) de tri-citrate de sodium à pH 8,5 (pH proche de celui du mucus utérin) et laissée à incuber à 37-38°C pendant trois heures. Les observations sont alors faites aux temps 0 et +3 heures.

6.10-Autres tests de qualité de la semence

Beaucoup d'autres tests différents pour apprécier la qualité de la semence ont été décrits dans la littérature; intégrité de l'acrosome, test GOT (glutamique oxaloacétique transaminase), aptitude des spermatozoïdes à se déplacer dans différents milieux y compris le mucus cervical. Des appareils très sophistiqués de mesure de la motilité de la semence ou du pourcentage de spermatozoïdes vivants, ou encore de paramètres composites de ces, caractéristiques, ont été décrits dans la littérature.

7. Préparation des paillettes d'IA :

7.1-Préparation des dilueurs :

Tableau4 : Préparation de dilueur

Pour utilisation sous forme liquide	
Jour -1	Préparation du dilueur
Jour 0	0 minute Collecte du sperme (32°C) Mesure du volume et identification du tube collecte
30secondes	Pré dilution de l'éjaculat (28-30°C) Motilité massale + concentration + calcul de la concentration finale
10minutes	Dilution finale (28-30°C), bouchage et homogénéisation de la solution. Placer le tube de collecte dans un verre plein d'eau (28-30°C) avec une ampoule congelée d'acide acétique et un thermomètre. Placer le tout dans un réfrigérateur (+6°C).
40minutes	Conditionnement en mini paillettes (0,25 ml) et conservation dans une bouteille thermos avec une ampoule d'acide acétique
8 heures	Limite pour l'utilisation en IA

Les techniques qui vont être décrites ici sont celles qui sont employées depuis de nombreuses années en France. Elles sont maintenant utilisées annuellement à grande échelle sur des dizaines de milliers de chèvres et des centaines de milliers de brebis. Toutefois, des méthodes différentes, utilisant notamment d'autres dilueurs, sont décrites dans la littérature.

7.2-Conditionnement en paillettes :

Après homogénéisation de la semence diluée, il est possible de remplir les paillettes soit par utilisation d'une machine, soit par aspiration buccale à travers le bouchon de l'extrémité de la paillette (figure 4). Après contact avec la semence, ce bouchon de polyvinyle forme une barrière étanche qui évite les pertes. Après quoi, en utilisant une seringue ou avec un bref mouvement de poignet, il est nécessaire de laisser 1 cm d'air à l'autre extrémité de la paillette afin de pouvoir obturer celle-ci avec de la poudre polyvinylique de couleur. Les paillettes, soigneusement séchées avec du papier, peuvent alors être employées.

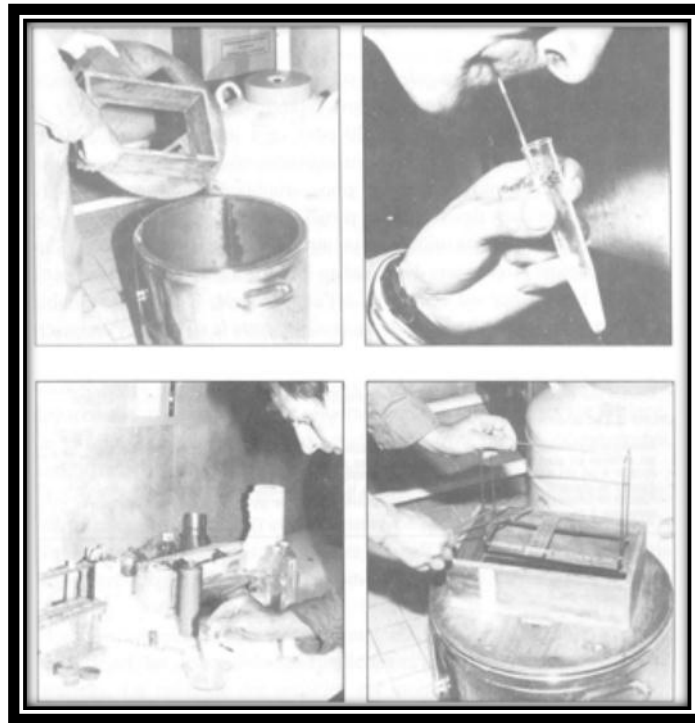


FIGURE 4 Préparation de la semence en paillettes: (a) matériel (paillettes, portoirs et récipient) (b) remplissage des paillettes pour l'azote liquide) (c) bouchage des paillettes avec l'alcool (d) mise en place des paillettes sur les polyvinyliques colorés portoirs pour la congélation (*Baril et al. 1993*)

8. Conservation à l'état congelé. La semence congelée demeure d'un emploi limité pour trois raisons essentielles. La fécondance de la semence congelée est d'environ 20 pour cent inférieure à celle de la semence fraîche, le nombre de spermatozoïdes nécessaires est plus élevé et la technique est plus coûteuse et plus compliquée à utiliser.

A l'avenir, et dans des situations particulières, la semence congelée sera probablement utilisée en IA intra-utérine qui permet le dépôt des spermatozoïdes directement dans l'utérus (voir plus loin IA par endoscopie).

Quand la semence est conservée à l'état congelé, il est indispensable d'effectuer différentes opérations successives entre la collecte et la conservation: dilution de la semence, diminution de température, conditionnement en paillettes ou en pastilles et congélation.

8.1-Dilution de l'éjaculat.

Après la collecte, la mesure de la motilité massale permet de sélectionner les éjaculats à congeler: la note de motilité massale ne doit pas être inférieure à 4,0. Les mesures de volume et de concentration permettent le calcul du taux final de dilution. Une fois celui-ci calculé, le processus de dilution comprend différentes étapes puisque deux dilueurs sont utilisés successivement. Pré dilution de l'éjaculat. Le pré dilution est faite comme pour la semence liquide, en utilisant le dilueur.

Calcul des différents volumes de dilueurs à ajouter. Après calcul de la concentration finale requise, les compléments nécessaires sont ajoutés. Le dilueur 2 est ajouté en deux étapes afin d'éviter un choc osmotique des spermatozoïdes. En résumé, les différents ajouts de dilueur sont les suivants: pré dilution, dilueur 1

1er dilution, dilueur 1

2e dilution, dilueur 2

3e dilution, dilueur 2

Diminution de la température. Pendant toutes ces opérations, il est nécessaire de refroidir progressivement l'éjaculat dilué jusqu'à +4°C, température à laquelle la semence sera conditionnée en paillettes et où débiteront les opérations de congélation.

Immédiatement après la collecte, le dilueur 1 est ajouté comme indiqué précédemment pour la semence à l'état liquide. Le tube de collecte est alors placé dans un verre d'eau à 28-30°C, lui-même placé dans la partie basse d'un réfrigérateur (+6°C). Après 30 minutes, la température de la semence (suivie avec un thermomètre placé dans l'eau autour du tube), descend à 13-15°C, et après deux heures à +6°C. A ce stade, la semence est placée directement dans le réfrigérateur ou la chambre froide. Le dilueur2 est ajouté à +4°C.

8.2-Congélation en paillettes. Le conditionnement en paillettes moyennes (0,50ml) est réalisé comme indiqué précédemment pour la semence liquide. La congélation des paillettes peut être réalisée en utilisant une machine ou bien en maintenant les paillettes pendant huit minutes, 20 cm au-dessus du niveau d'azote liquide, dans les vapeurs de celui-ci (-75°C) puis en les plongeant directement dedans (figure 5). Dans ce dernier cas, l'utilisation d'un thermocouple au niveau des paillettes pour suivre la température, est recommandée. (*Baril et al. 1993*).

9. Espèce caprine

Dans cette espèce, l'existence d'enzymes dans le plasma séminal, qui agissent sur les phospholipides du dilueur pour libérer des composés toxiques pour le spermatozoïde, entraîne une manipulation de la semence différente de celle de l'espèce ovine. Chez le bouc, il est particulièrement recommandé de séparer le plasma séminal, dès que possible après la récolte, afin de limiter son contact avec les dilueurs.

Pour l'utilisation de semence fraîche, la dilution directe de l'éjaculat dans un dilueur au lait de vache écrémé est possible, mais la présence de jaune d'oeuf dans le milieu de dilution est à proscrire. Si le dilueur en contient, il est alors absolument nécessaire d'effectuer un lavage de la semence avant dilution.

9.1-Lavage de la semence de bouc

Le lavage de la semence dès la collecte est réalisé en suspendant le sperme dans une solution Krebs-Ringer-Phosphate (solution «de lavage») contenant du glucose, puis en centrifugeant le mélange pour éliminer le plasma séminal. Deux lavages successifs sont préférables à un seul lavage (*Baril et al. 1993*).

La procédure est décrite ; les différentes étapes sont les suivantes:

Préparation de la solution de lavage (voir composition au tableau 20), la veille de la collecte.

Dilution et centrifugation. Au moment de la collecte, l'éjaculat est dilué avec la solution de lavage de façon à obtenir une concentration de 400×10^6 spermatozoïdes/ml de la suspension à centrifuger. Le tube de collecte est alors placé dans une centrifugeuse pendant 15 min, à une accélération de 500-600 g (voir figure 52 pour le calcul de la force centrifuge). Après quoi, le surnageant est éliminé avec une pipette et un nouveau volume, identique, de solution de lavage est ajouté; le tube est centrifugé une seconde fois durant 15 minutes. Le surnageant est à nouveau éliminé et les spermatozoïdes sont alors dilués dans le volume

nécessaire de dilueur de conservation au lait de vache écrémé. La semence diluée est alors prête à être traitée pour l'utilisation sous forme liquide ou pour la congélation.

Tableau 5 : Résumé des différentes étapes de lavage et de traitement de la semence de bouc pour utilisation sous forme liquide ou congelée (*Baril et al. 1993*)

Jour-1	Préparation de la solution de lavage et du dilueur
Jour 0	Collecte du sperme (32°C) Mesure du volume + identification
0 min	du tube de collecte + motilité massale + concentration
30 s	1re addition de solution de lavage (28-30°C)
	1re centrifugation (500-600 g, voir figure 52, 15 min, 20°C)
15 min	Elimination du surnageant, 2e addition De solution de lavage et centrifugation dans les mêmes conditions
Forme liquide	
35 min	Dilution finale (20°C), homogénéiser. Placer le tube dans un verre plein d'eau (20°C) avec un thermomètre, dans le réfrigérateur (+6°C).
65 min	Conditionnement en paillettes et conservation en bouteille thermos avec une ampoule d'acide acétique dégelée. (13-15°C)
8h	Limite d'utilisation en IA
Forme congelée	
35 min	Moitié de la dilution finale (20°C), homogénéiser. Placer le tube dans un verre plein d'eau (20°C) avec un thermomètre, dans le réfrigérateur (+6°C)
2h	1re partie de dilueur glycérolé (+4°C)
2h10min	2e partie de dilueur glycérolé (+4°C)
2h20min	3e partie de dilueur glycérolé (+4°C)
3h10min	Conditionner en paillettes de 0,25 ml Congeler dans les vapeurs d'azote; conserver dans l'azote liquide (-196°C)

Diminution de température. Après la collecte, le tube de collecte est placé dans le bain-marie à 28-30°C. La solution de lavage, à la même température, est ajoutée; la première et la seconde centrifugation ainsi que le second ajout de solution de lavage sont effectués à température ambiante (20°C). A la fin de la seconde centrifugation, après élimination du surnageant, le dilueur est ajouté à température ambiante (*Baril et al. 1993*).

Tableau 6 : Préparation de la solution de lavage pour le sperme de bouc (solution Krebs-Ringer-phosphate-glucose à préparer la veille de la collecte)

Solutions mères (concentrations finales de l'eau bi distillée) dans	Volume de solution mère dans le soluté final
0,9 pour cent NaCl	100,0
1,15 pour cent KCl	4,0
1,22 pour cent CaCl ₂	3,0
2,11 pour cent KH ₂ PO ₄	0,4
3,82 pour cent MgSO ₄ , 7H ₂ O	1,0
Tampon phosphate pH 7,4a	12,0
5,34 pour cent glucose anhydre Ces solutions	
Doivent être mélangées dans cet ordre 4,5	

a- Pour préparer le tampon phosphate, dissoudre 35,81 g de Na₂HPO₄, 12 H₂O dans 20 ml de HCl/Nb. Compléter cette solution en ajoutant le volume nécessaire d'eau bi distillée pour obtenir 1 000 ml de tampon.

b- préparer HCl/N (densité = 1,19): 50 ml d'eau bi distillée + 84,7 ml de HCl + le volume d'eau nécessaire pour obtenir 1 000 ml de solution finale.

Cette solution doit être conservée à +4°C, 2 à 3 jours au maximum, après quoi des cristaux apparaissent qui peuvent endommager les spermatozoïdes lors de la centrifugation. Les solutions mères peuvent être conservées une semaine à +4°C. *Source:* Cortell, 1974. Préparation des douleurs, la veille de la collecte; dilution et diminution de la température. , (Baril et al. 1993)

Après avoir calculé le volume de dilueur à ajouter pour aboutir au nombre et à la concentration corrects de spermatozoïdes dans les paillettes qui peuvent être utilisées directement pour l'AI (voir l'espèce ovine pour un exemple de calcul), effectuer le traitement suivant:

- Ajouter le volume correct de dilueur maintenu à température, ambiante;
- Placer le tube de collecte dans un verre d'eau (à température ambiante) dans bas du réfrigérateur (+6°C) durant 30 minutes pendant lesquelles la température de la semence (suivie par un thermomètre placé dans l'eau entourant le tube) descend à 13-15°C;

-Dans ces conditions, il est recommandé d'utiliser la semence dans les huit heures qui suivent la collecte.

Tableau 7 : Préparation des dilueurs pour la semence de bouc (*Baril et al. 1993*)

Dilueur au lait de vache écrémé
• dissoudre 194 mg de glucose anhydre dans 100 ml d'eau bi distillée
• dissoudre, dans cette solution, 10 g de poudre de lait de vache écrémé (contenant
Moins de 1 pour cent de matière grasse)
• faire bouillir au bain-marie pendant au moins 15 minutes
• refroidir à température ambiante
• ajouter 50 mg de streptomycine et 50 000 UI de pénicilline
• conserver à +4°C 2 à 3 jours au maximum
<i>Dilueur citrate-jaune d'oeuf</i>
•dissoudre 194 mg de glucose anhydre dans 100 ml d'eau bi distillée
• dissoudre 3,52 g de citrate de sodium et compléter à 100 ml
• ajouter 20 ml de jaune d'oeuf à 80 ml de la solution précédente
• ajouter 50 mg de streptomycine et 50 000 UI de pénicilline
• conserver à +4oC 2 à 3 jours au maximum

Dilueur glycérolé: ajouter 14 pour cent de glycérol (concentration finale) aux solutions précédentes, afin que la concentration finale de glycérol, dans la solution à congeler, soit de 7 pour cent.

9.2-Utilisation sous forme congelée

On peut utiliser les deux mêmes dilueurs que pour la semence fraîche (lait de vache écrémé et jaune d'œuf), avec les mêmes précautions concernant le plasma séminal. Toutefois, dans le cas de la semence congelée de bouc, il peut être bénéfique d'utiliser les caractéristiques cryoprotectrices du jaune d'œuf.

De la même façon que pour la semence de bélier, il est strictement recommandé d'éviter tout choc thermique des spermatozoïdes.

Une fois les opérations de lavage effectuées et après avoir calculé le volume total de dilueur à ajouter, on procède de la façon suivante:

Ajouter le volume correct de dilueur non glycérolé (même composition que pour la semence liquide), maintenu à température ambiante, en tenant compte du fait qu'une seconde addition de dilueur glycérolé sera effectuée plus tard.

Placer le tube de collecte dans un verre d'eau (à température ambiante), au réfrigérateur (+6°C). Après 30 minutes, mettre le tout dans un bain glacé pour faire descendre cette température à +4°C.

Une fois cette température atteinte, placer directement le tube de collecte dans le réfrigérateur ou la chambre froide.

Ajouter le dilueur glycérolé (à 14 pour cent de glycérol). Le volume total de dilueur glycérolé (qui est identique au volume total de dilueur ajouté après lavage) doit être divisé en trois fractions successives ajoutées à 10 minutes d'intervalle.

La congélation peut se faire en utilisant une machine dans laquelle la température est programmée, ou en manipulant les paillettes comme suit:

- paillettes moyennes (0,50 ml), cinq minutes à 4 cm au-dessus du niveau d'azote liquide, dans les vapeurs, les plonger ensuite directement dans l'azote;
- paillettes fines (0,25 ml), deux minutes à 16 cm au-dessus de l'azote liquide, puis trois minutes à 4 cm au-dessus du niveau d'azote liquide et, finalement, les plonger directement dans l'azote.

. Mesure de l'aptitude des spermatozoïdes à supporter la congélation. La paillette congelée (ou la pastille) est prélevée directement de l'azote liquide et placée dans un bain-marie (ou un tube en verre fin) à 37-38°C pendant 30 secondes (même opération que pour l'ia); son contenu est ensuite dilué pour incubation et observation microscopique.

Pour une IA exo cervicale, il est recommandé d'utiliser seulement les éjaculats qui contiennent plus de 15 pour cent de cellules vivantes avec une motilité individuelle de 2,5, 180 minutes après dégel.

Afin d'assurer des conditions de stockage convenables, les paillettes doivent être conservées en permanence dans l'azote liquide et prélevées de celui-ci juste avant l'IA.

Pour l'IA, il est recommandé d'utiliser seulement des éjaculats contenant au moins 30% de spermatozoïdes mobiles avec une motilité de 3,0 ou plus, l'observation étant réalisée cinq minutes après dégel. Comme pour la semence de bélier, les paillettes doivent être conservées en permanence dans l'azote liquide. Le dégel se fait de la même façon que dans l'espèce ovine.

Référence

***01-Année 2008-2009 Prof. Ch. Hanzen -Ll'insémination artificielle chez les ruminants
Collection et conservation de semence***

***02-Epstein (1971), Esperandieu.H. (1975), Mason (1984), Vigne (1988), et Lauvergne J.J
(1988)***

03-FAO database February 2012 Sources statistiques agricoles

04-French 1971

05-GEOFFROY.H. (1919) et MAMET .R. (1971)

06-Holmes-pegler (1966), Babo (2000) et Fournier (2006),

***07-Baril, G., Chemineau, P., Cognie, Y., Guérin, Y., Leboeuf, B., Orgeur, P., Vallet, J-C.,
(1993).Manuel de formation pour l'insémination artificielle chez les ovins et les caprins***

***.Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture.FAO, Rome, Italy.
125P.***

08-Points d'intérêt de l'IA (N.Hagen ENVT)

09- Habbi w mfe. Habbi wafa 2014 Mémoire de fin d'étude