

# TRAITEMENT DE LA SEMENCE DE BOUC POUR UNE CONSERVATION DE LONGUE DURÉE DANS L'AZOTE LIQUIDE AVANT INSÉMINATION ARTIFICIELLE

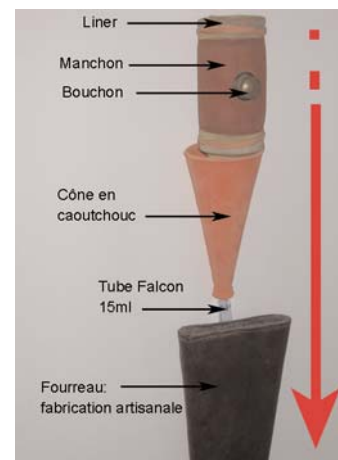


Centre de Ressources  
et Documentation Caprine

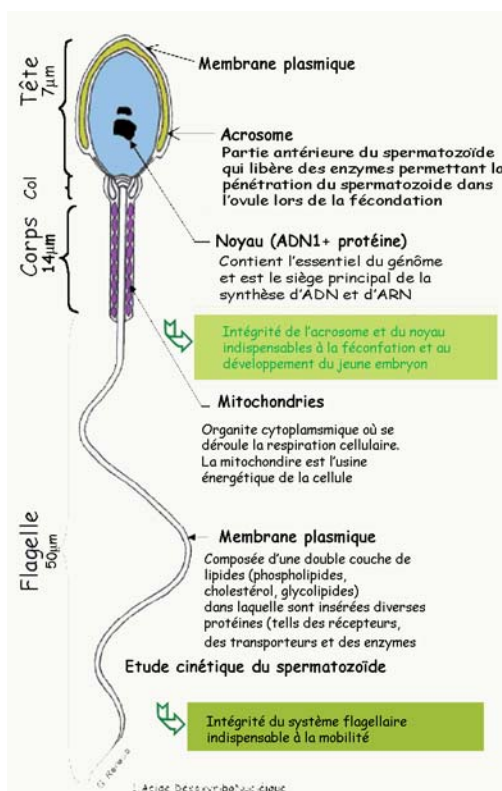
Le programme de sélection mis en place par Capgène France consiste à améliorer la production laitière et les caractères morphologiques des chèvres laitières. Ce programme repose en partie sur la reproduction par insémination artificielle pour la diffusion à grande échelle des gènes d'intérêt. Dans le cadre de l'organisation de l'IA caprine en France, la semence est conservée dans l'azote liquide pour un stockage de longue durée

On définit la capacité des spermatozoïdes à se déplacer par différentes techniques. La plus utilisée est l'observation directe au microscope optique. Deux critères sont observés, la mobilité (% de spermatozoïdes qui se déplacent) et la motilité (évalue la nature du déplacement par une note de 0 à 5 : pas de mouvement, déplacements lents et tremblement, déplacements curvilinéaires sans tremblement, déplacements rapides avec trajectoire courbe, déplacements rectilignes et rapides).

périodique. Ainsi les collectes peuvent être réalisées toute l'année. Le manchon est rempli d'eau



REPRODUCTION



L'acrosome est la partie de la tête du spermatozoïde qui va permettre la pénétration dans l'ovule et ainsi libérer le matériel génétique contenu dans le noyau. Pour cela il est indispensable que l'acrosome soit intact. Lors d'expérimentations on utilise une coloration avec une sonde fluorescente (PSA-FITC) qui colore l'acrosome et permet de visualiser les malformations. La membrane plasmique protège le spermatozoïde du milieu dans lequel il se trouve. Une modification de sa teneur lipidique peut affecter la fluidité et la perméabilité de la membrane. Ainsi une baisse de la fluidité membranaire va rendre la cellule plus sensible aux variations de température, d'où l'importance du milieu dans lequel les spermatozoïdes sont conservés.

## COLLECTE DE LA SEMENCE

Les collectes sont réalisées sur des boucs du schéma de sélection, adultes améliorateurs (L'égide n°39-Juin 2005) ou jeunes pour le testage sur descendance. Pour s'affranchir des variations saisonnières de la production quantitative et qualitative de semence, les boucs des centres de production de semence (Capgènes et INRA) sont soumis à un traitement photo-

Le spermatozoïde doit être capable de remonter le tractus femelle pour assurer la fécondation de l'ovule. Pour cela il est indispensable que les fonctionnalités du spermatozoïde soient préservées au cours de la conservation, particulièrement l'intégrité de la membrane plasmique et l'acrosome ainsi que l'intégrité du flagelle et des mitochondries pour assurer la mobilité de cette cellule vers le site de fécondation.

à 40 °C et l'ensemble des éléments du vagin artificiel sont mis à 37 °C. Une femelle bout en train est installée, le mâle est alors en contact. Au moment du saut, le pénis du mâle s'introduit dans le vagin artificiel et l'éjaculation se fait de façon quasi immédiate. On définit alors le comportement du bouc (saut sans éjaculation, éjaculation sans saut, refus, urine...). L'éjaculat est alors transmis au laboratoire à proximité de la salle de collecte.

## TRAITEMENT DE LA SEMENCE

Le laboratoire doit être à une température constante de 20 °C, l'éjaculat est aussitôt traité. 50µl sont prélevés pour estimer la concentration de l'éjaculat en spermatozoïdes à l'aide d'un photomètre, la concentration varie de 1 à 8 milliards de spermatozoïdes totaux par ml. On regarde par la suite le volume de l'éjaculat par pesée, celui-ci varie de 0,1 à 2,5 ml. L'éjaculat est constitué de spermatozoïdes et de plasma

séminal. Ce dernier contient une enzyme, la lipase, qui a un effet délétère sur la qualité des spermatozoïdes lorsqu'ils sont soumis à des variations importantes de températures occasionnant des contraintes physiques fortes au niveau de sa membrane plasmique. C'est le cas pour les spermatozoïdes soumis à la congélation dans l'azote liquide (-196°C).

Pour limiter ces risques la semence est débarrassée du plasma séminal par "lavage" : une solution saline (Kreps-Ringer-Phosphate) à 37°C est rajoutée à la semence, puis l'ensemble est centrifugé 15 min à 600g. Le surnageant est éliminé et le culot contenant uniquement les spermatozoïdes est remis en suspension avec le même volume de solution de lavage mais à 20°C (température du laboratoire). Après la 2ème centrifugation le culot est remis en suspension dans du lait écrémé (milieu de conservation des spermatozoïdes pour la congélation), de façon à obtenir une suspension de 1 milliard de spermatozoïdes par ml. À ce stade l'éjaculat est à une température de 20°C ; il va falloir abaisser sa température à 4°C de façon progressive (0,3°C/mn) afin de réduire le métabolisme du spermatozoïde sans altérer ses fonctionnalités. Ce processus est réalisé en chambre froide.

Il reste à évaluer la qualité de l'éjaculat. Pour cela on prélève de la semence refroidie à 4°C que l'on met dans un tube contenant le milieu à base de lait à 37°C. Sur cette dilution, on réalise une observation au microscope afin de définir la mobilité et la motilité du spermatozoïde. Les éjaculats qui ont une mobilité inférieure à 50% et une motilité inférieure à 3 sont éliminés.

Les éjaculats restant sont de nouveau dilués de façon à obtenir une dilution à 500 millions de spermatozoïdes, on ajoute le dilueur lacté à 4°C contenant 14% de glycérol pour une concentration finale

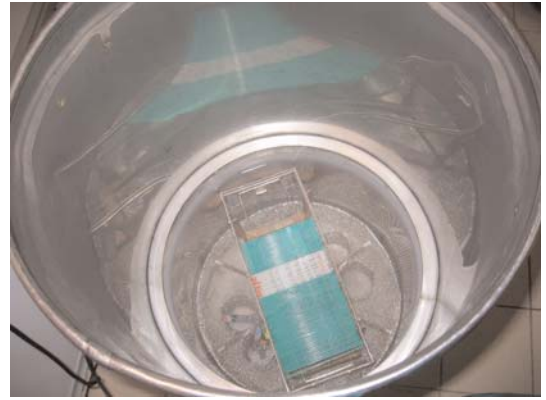
de 7%. Le glycérol est un cryoprotecteur, il assure la fonction d'"antigel" sur le spermatozoïde. C'est un composé hydrosoluble capable de former des liaisons hydrogènes avec les molécules d'eau et de pénétrer les cellules. Son action repose sur sa capacité à abaisser le point de congélation et à limiter la vitesse de croissance des cristaux de glace.

Cette étape de rajout du glycérol à 14 % se fait en 3 fois espacées de 10 minutes de façon à ce que les spermatozoïdes s'adaptent progressivement à la pression hyperosmotique due à la présence du glycérol dans ce milieu. Suite au dernier rajout, on attend 1h30 pour permettre une équilibration osmotique entre le milieu extérieur et l'intérieur de la cellule, avant d'effectuer la mise en paillettes et la congélation.

La semence est conditionnée en paillette de 0,25ml contenant chacune 100 millions de spermatozoïdes.

Les paillettes sont identifiées avec le n° de centre, nom du bouc, le n° à 10 chiffres du bouc, la race, l'année et le code à 1 lettre et 3 chiffres du boucs. Elles sont de couleurs différentes en fonction de la race du bouc. Le tube de semence est homogénéisé par retournement du tube, la semence est mise dans la paillette, soit mécaniquement, soit manuellement par aspiration. Un vide est réalisé pour éviter que la paillette n'éclate à la congélation du fait d'une augmentation de volume au moment du passage de la phase liquide à la phase solide.

Les paillettes sont bouchées avec de la poudre d'alcool polyvinylique ou serties. Elles sont disposées sur une rampe et prêtes pour la congélation. L'abaissement de la température en cours de congélation (de +4°C à -196°C) doit s'effectuer sur la base de 25°C/min entre +4°C et -110°C/-120°C puis immersion dans l'azote liquide. Ensuite les paillettes sont plongées dans des canisters et mises dans une cuve



de stockage de transit. Les paillettes restent dans cette cuve dans l'attente du contrôle de la qualité des spermatozoïdes.

La qualité de chaque éjaculat est contrôlée après congélation. Cet examen se fait au minimum 48h après la congélation. La paillette est décongelée et diluée dans le milieu lacté à 37°C. Un examen au microscope est réalisé pour évaluer la mobilité et la motilité. Les éjaculats qui ont des notes inférieures à 30% de mobilité et 3 de motilité sont éliminés. Environ 30% des éjaculats sont éliminés après la congélation. Les paillettes sont par la suite stockées en cuve d'azote dans l'attente de l'IA.

La congélation de la semence a un coût relativement élevé dû au temps de traitement et congélation de la semence, à l'utilisation d'azote liquide et aux pertes d'éjaculats causées par la dégradation des spermatozoïdes lors de la phase de refroidissement.

Actuellement, les études visent à limiter le nombre d'éjaculats éliminés suite à une mauvaise qualité à la décongélation sans diminuer la fertilité et à développer un programme de conservation de la semence fraîche à 4°C pour maintenir le pouvoir fécondant des spermatozoïdes sur une durée d'au moins 3 jours, pour une souplesse d'utilisation de cette technique à grande échelle.

Ainsi, l'IA en semence fraîche, technique économique, pourrait être utilisée en complément de la semence congelée, notamment pour la diffusion du quart des boucs du schéma de sélection dont la semence ne supporte pas la congélation.