

Microbiological quality of fresh sperm and ready-to-use semen of artificial insemination bulls in Tunisia

Qualité microbiologique du sperme frais et de la semence prête à l'emploi issues des taureaux d'insémination artificielle en Tunisie

S. KHLADI¹, A. NAJJAR², S. BEN SAÏD³, R. GUESMI³, A. JELJLI¹, I. ZAIDI⁴, M. DAALOUL¹, L. MESSADI¹

¹ École Nationale de Médecine Vétérinaire de Sidi Thabet, Tunisie

² Institut National Agronomique de Tunisie

³ École Supérieure d'Agriculture du Kef, Le Kef, Tunisie

⁴ Direction de l'Amélioration Génétique, Office de l'Élevage et des Pâturages, Tunisie

*Corresponding author: sana.khladi@gmail.com

Abstract – This work aims to study the microbiological quality of fresh semen and ready-to-use semen straws sampled from clinically healthy bulls. A fraction of the ejaculate of 6 bulls belonging to 3 different breeds (n = 6, mean age = 36 ± 19 months, 2 Holstein, 2 Brown Swiss and 2 Tarentaise) is used to establish a spermogram and to carry out a bacterial culture, on the fresh sample, and after conditioning (number of ejaculates = 12, number of straws = 12). The results reveal that the breed has no significant effect on the ejaculate volume or on the percentage of motile spermatozoa, compared to a significant effect on the total number of spermatozoa per ejaculate (p < 0.05). Several bacterial species have been found after culture in the fresh sperm, and in frozen-thawed semen, some of which are potentially pathogenic. These bacteria can be of the same species in the fresh sperm and in the straw obtained from the same ejaculate, or can be of different species which raises the problem of contamination during the collection, the manipulation or the storage of the semen.

Keywords: semen, bulls, artificial insemination, quality, bacteriology

Résumé – Le but de ce travail est d'étudier la qualité microbiologique du sperme frais et de la semence conditionnée en paillettes prêtes à l'emploi, de taureaux cliniquement sains. Une fraction de l'éjaculat de 6 taureaux de 3 races différentes (n= 6, âge moyen = 36 ± 19 mois, 2 Holstein, 2 Brown Swiss et 2 Tarentaise) est prélevée pour établir un spermogramme et de réaliser une culture bactérienne sur le prélèvement frais, et après conditionnement (nombre d'éjaculats = 12, nombre de paillettes = 12). Les résultats révèlent que la race n'a pas d'effet significatif sur le volume de l'éjaculat ni sur le pourcentage des spermatozoïdes mobiles, contre un effet significatif sur le nombre total de spermatozoïdes par éjaculat (p < 0,05). Plusieurs espèces bactériennes ont été retrouvées après la culture dans le sperme frais, et dans la semence décongelée, dont certaines sont potentiellement pathogènes. Ces bactéries peuvent être de mêmes espèces dans le prélèvement à l'état frais et après conditionnement-congélation-décongélation, ou être d'espèces différentes ce qui soulève le problème de la contamination lors de la collecte, de la manipulation ou lors d stockage.

Mots clés : semence, taureaux, insémination artificielle, qualité, bactériologie

1. Introduction

La réussite de l'insémination artificielle est le point clé de l'organisation et de la rentabilisation de l'élevage, à travers la production d'une descendance génétiquement améliorée, la planification des mises bas (et donc de la production laitière), et en contrôlant la transmission des maladies vénériennes. La réussite de l'insémination artificielle dépend essentiellement de trois facteurs : une conduite d'élevage

bien maîtrisée, le respect des règles fondamentales de la mise en place et une semence de qualité biologique irréprochable.

L'obtention d'un éjaculat complètement stérile est probablement impossible (Thibier et Guérin 2000). Il serait toutefois important de contrôler la flore y vivant, dans le but d'éviter la contamination des femelles inséminées, des élevages sains et des pays indemnes, par des germes spécifiques ou non. De part le monde et le plus souvent, un soin particulier est dédié à l'exécution du spermogramme afin de produire de la semence bovine assurant de bonnes performances de reproduction, alors que l'étude de la qualité microbiologique de la semence est laissée pour compte malgré son importance primordiale, à cause de son coût élevé, et des contraintes imposées pour sa réalisation. Dans cette optique le présent travail s'intéresse à l'étude de la qualité microbiologique du sperme de certains géniteurs du Centre d'Amélioration Génétique (CAG) de Sidi Thabet, Tunisie, et après conditionnement, de la semence prête à l'insémination, mise à la disposition des éleveurs et des inséminateurs.

2. Matériel et Méthodes

2.1. Généralités

Le présent travail s'est déroulé durant la période mars – mai 2017, entre le Centre d'Amélioration Génétique (CAG) de Sidi Thabet et le service de Microbiologie de l'Ecole Nationale de Médecine Vétérinaire de Sidi Thabet (ENMV), au nord de la Tunisie. Le sperme de taureaux cliniquement sains a été récolté au CAG. L'analyse du spermogramme et le processus de conditionnement et de congélation de la semence ont été aussi effectués dans le même centre. Quant à l'analyse bactériologique a été effectuée au service de Microbiologie de l'ENMV.

2.2. Animaux

La semence de 6 taureaux (âge moyen = 36 ± 19 mois, Tableau 1) de race Holstein, Brown Swiss et Tarentaise ($n = 2$ / race) a été récoltée une fois par 15 jours. La récolte a été effectuée par un vagin artificiel (IMV, France) et un taureau boute-en-train. Pour chaque taureau, la collecte de sperme se déroule selon une routine bien rôdée, sensée stimuler la libido. Le nombre de sauts préalables à la collecte du sperme diffère d'un centre à l'autre, et d'un animal à l'autre (Gerard et Khireddine 2002), et est généralement de 2 au CAG de Sidi Thabet.

Tableau 1. Âge des taureaux et nombre de prélèvements de l'étude

Races	Tarentaise	Holstein	Brown Swiss
Age moyen (mois)	49,5	30	29
Ecart-type (mois)	31	15	10
Nombre de prélèvements	4	4	4

Les taureaux sont sélectionnés à partir de fermes contrôlées par l'état, en fonction de leur pedigree, et des performances de leurs mères et de leurs sœurs, et sont élevés au CAG depuis leur jeune âge. Au centre, ces géniteurs sont logés dans des boxes individuels, composés chacun d'une aire abritée et une autre d'exercice avec une aire libre. Ils reçoivent quotidiennement une ration composée de 6 Kg de concentré en 2 repas (orge, maïs, tourteau de soja, bouchons de luzerne selon disponibilité) et de la paille ad libitum. Ces animaux reçoivent un supplément minéralo-vitaminé en cas de besoin, particulièrement lorsque la qualité du sperme diminue.

2.3. Analyse de la qualité du sperme frais

Les éjaculats récoltés ont subi une analyse du spermogramme. Pour cela, le volume de l'éjaculat (ml) a été déterminé par simple lecture de la graduation du tube collecteur. Le pourcentage de spermatozoïdes mobile (% SM) a été déterminé en observant une goutte de semence pure entre lame et lamelle au grossissement (x10). La concentration du sperme en spermatozoïdes a été déterminée par un spectrophotomètre de type SDM 6® après dilution d'un échantillon de sperme pure a dans une solution de formaldéhyde au 1/40^{ème} par réfraction de la lumière à une longueur d'onde de 546 nm sur le mélange. Ensuite, le nombre total de spermatozoïdes dans l'éjaculat (NTS) en milliards a été déduit par multiplication de la concentration par le volume de l'éjaculat. Le nombre de paillettes par éjaculat a été aussi calculé par le spectrophotomètre.

2.4. Conditionnement et congélation de la semence

Avant le processus de conditionnement et congélation de la semence, les paillettes vides ont été identifiées automatiquement par une machine à imprimer (IMV, France). Ensuite, le conditionnement de la semence en paillettes de 0,25ml est effectué suite à la dilution de la semence par le dilueur Bioxcell® (IMV, France). Le volume de dilution est déterminé en fonction de la concentration et du pourcentage des spermatozoïdes mobiles. Le conditionnement des paillettes a été effectué à +4°C dans une vitrine réfrigérée pendant 1 heure 20 minutes. Les paillettes ont été rangées dans une rampe de congélation et mises dans un mini – digit cool. Ce dispositif assure la diminution graduelle de la température de +4°C à –140°C à une vitesse de 60°C/minute. Les paillettes sont ensuite plongées rapidement dans un container d’azote liquide à –196°C.

2.5. Analyses bactériologiques

Une analyse de la qualité bactériologique des éjaculats a été effectuée en 2 étapes : i) sur le sperme frais et ii) sur la semence conditionnée après décongélation. Pour cela, l’ensemencement a été fait à partir d’un échantillon non dilué, sur un milieu de culture approprié, généralement la gélose au sang, en vérifiant que les conditions nécessaires de développement et de croissance des micro-organismes sont remplies (O₂, nutrition, CO₂, lumière). La boîte de pétri est mise à l’incubation pendant 24 à 48h en anaérobiose à 37°C. Lors de la croissance de 2 types de colonies bactériennes ou plus, on procède au ré-isolement par transfert de la colonie en question dans le bouillon cœur-cerveille ; puis une goutte du mélange sera repiquée sur une nouvelle gélose au sang.

L’identification de l’espèce bactérienne se fait par appréciation des caractéristiques macroscopiques de la colonie en croissance, la coloration de Gram dans un deuxième temps, et par détermination de ses propriétés biochimiques, à travers la culture des bactéries Gram - sur des milieux spécifiques : Le milieu de Kligler- Hajna, le milieu urée-indole, le milieu citrate de Simmons et le milieu mannitol-mobilité (Najjar et al. 2010).

2.6. Analyses statistiques

Les données brutes et l’analyse descriptive des résultats de la bactériologie ont été respectivement récoltées puis traitées sur Excel (version 2003). Une analyse de la variance a été faite par la procédure GLM (General Linear Model), en utilisant le logiciel SAS (SAS Institute Inc.®) dans le but d’étudier l’effet de la race des taureaux sur les paramètres du spermogramme. Le test de comparaison des moyennes Duncan a été utilisé pour comparer les variables entre les races, et le seuil de signification a été fixé pour $p < 0,05$.

3. Résultats et Discussion

Immédiatement après la récolte, les éjaculats sont acheminés au laboratoire du CAG pour être évalués, et être conditionnés s’ils sont jugés de bonne qualité. Le tableau 2 illustre la variation de certains paramètres du spermogramme, en fonction de la race des taureaux, ceux-ci sont tous considérés comme jeunes puisque le plus âgé d’entre eux n’a que 6 ans, et tous sont conduits de la même manière. Nous remarquons que la race n’a aucun effet sur les paramètres volume et pourcentage des spermatozoïdes mobiles, alors qu’elle exerce un effet significatif sur le nombre total des spermatozoïdes.

Tableau 2. Variation des paramètres du spermogramme en fonction des races des taureaux (moyennes ± sem)

Races des taureaux	Volume (ml)	%SM (%)	NTS (en milliards)
Tarentaise	5,25 ± 2,5	60 ± 7	1,3 ± 0,7 ^a
Holstein	5,5 ± 1,3	56 ± 11	1,6 ± 0,7 ^a
Brown Swiss	4,5 ± 1	60 ± 4	0,4 ± 0,1 ^b

%SM : pourcentage de spermatozoïdes mobiles

NTS : nombre total de spermatozoïdes

a, b : $p < 0,05$

La muqueuse préputiale et l’urètre hébergent d’une flore bactérienne variée (Fish and al. 1985) pouvant contaminer la semence au moment de l’éjaculation et pourrait transmettre des germes pathogènes du

mâle à la femelle lors de la saillie naturelle ou de l'insémination artificielle. En outre, la haute contamination du sperme en germe altère la qualité du sperme et la viabilité des gamètes (Parez 1985). Cette étude a permis la mise en évidence d'au moins 9 micro-organismes (Tableau 3), résultats en concordance avec des travaux antérieurs portant sur la qualité bactériologique de la semence bovine. En effet, Gunsalus et al. (1941) mentionne l'existence de *Proteus*, streptocoques, *Pseudomonas*, des cocci et des bacilles dans le sperme collecté par un vagin artificiel ; les mêmes genres bactériens ont été retrouvés par Smole et al. En 2010, qui affirment que certaines bactéries font naturellement partie de la microflore préputiale. D'autres auteurs (Corbeil et al. 1985 ; Wentink et al. 2000) rapportent l'existence de *Pasteurella multocida* dans le fourreau, et assurent que sa transmission à la femelle par la semence ne se fait que rarement, lors d'une contamination fortuite de la semence.

Tableau 3. Identification et fréquence d'apparition de la flore bactérienne en fonction du type de la semence.

Semence Fraîche									
<i>Streptococcus</i>	<i>Pseudomonas</i>	Coque Gram+	<i>Proteus</i>	Bactérie Gram-	Levure	Bactérie Gram+	Microcoques	<i>Klebsiella</i>	Entérobactéries
+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
(4/12)	(3/12)	(1/12)	(1/12)	(1/12)	(1/12)	(1/12)	(1/12)	(0/12)	(0/12)
Semence décongelée									
<i>Streptococcus</i>	<i>Pseudomonas</i>	Coque Gram+	<i>Proteus</i>	Bactérie Gram-	Levure	Bactérie Gram+	Microcoques	<i>Klebsiella</i>	Entérobactéries
+	+	-	-	-	-	+	+	+	+
(5/11)	(2/11)	(0/11)	(0/11)	(0/11)	(0/11)	(1/11)	(1/11)	(1/11)	(1/11)

Tous les taureaux du centre sont cliniquement sains d'une manière générale et particulièrement sur le plan génital, et ce malgré la présence de bactéries potentiellement pathogène dans leurs éjaculats. La même constatation a été faite par Smole et al (2010) et Corbeil et al. (1985) qui rapportent l'existence de *Proteus*, de *Streptococcus* et de *Pseudomonas* dans le sperme frais, Corbeil et al. ont de plus retrouvé *Pasteurella multocida*, potentiellement responsable de troubles respiratoires, mais sans aucun symptôme chez le porteur. Ces mêmes auteurs émettent l'hypothèse que les manifestations cliniques dues aux bactéries pathogènes ne se déclarent qu'à la faveur d'une baisse de l'immunité, ou une perturbation de la flore préputiale, ou du stress.

Un seul de nos échantillons de sperme frais abrite une levure, mais toutes les paillettes en sont indemnes. Ceci concorde avec l'étude de Dion (1979) qui n'a trouvé aucune colonie de levure en analysant 80 paillettes. Toutefois Richard et al. (1976) rapportent l'existence de 9 espèces différentes de levures à partir du sperme frais de 32 taureaux, sur un ensemble de 62 animaux, avec une prévalence importante de *Candida tropicalis* et de *C.parsipolis*

Il est intéressant à signaler que Gunsalus et al. (1941) et Smole et al. (2010) rapportent une diminution considérable de cette population microbienne dans le sperme frais, après l'élimination des poils autour du prépuce, le nettoyage et/ou la désinfection du fourreau ou même le simple rinçage à l'eau distillée. Par ailleurs, l'utilisation du même vagin artificiel pour plusieurs géniteurs, le matériel mal nettoyé, le lubrifiant et même le dilueur peuvent constituer une source de contamination, ce qui explique non seulement la coexistence de différentes espèces microbiennes dans le sperme frais et dans la semence conditionnée, mais aussi l'existence d'un grand nombre de colonies bactériennes dans les prélèvements (tableau 4). Certains de nos prélèvements se sont révélés stériles à la culture bactérienne

Tableau 4. Variation du pourcentage des prélèvements en fonction du nombre des colonies bactériennes.

Nombre de colonies (NC)	NC <100	100 < NC < 300	NC > 300
Semence fraîche (%)	50 (6/12)	8,5 (1/12)	25 (3/12)
Semence décongelée (%)	36,5 (4/11)	9 (1/11)	36,5 (4/11)

L'azote liquide reste également une des sources sous-estimées de la contamination de la semence. En effet, Grout et Morris (2009) considèrent que certaines bactéries ont la capacité de persister dans le vapeur d'azote et contamine ainsi les échantillons dans le conteneur. Il est évidemment difficile de

quantifier le risque d'une contamination à partir des vapeurs d'azote, mais les répercussions sanitaires, environnementales et légales sont considérables (Grout et Morris 2009).

La plupart des paillettes examinées abritent les mêmes bactéries retrouvées dans le sperme frais. Les implications de ce résultat sont alarmantes puisque ces micro-organismes sont résistants aux antibiotiques contenus dans le dilueur, ainsi qu'aux très basses températures, particulièrement pour le traitement des maladies vénériennes chez le taureau et les infections utérines de la vache.

4. Conclusion

Malgré toutes les mesures de prévention, la semence conditionnée pourrait véhiculer des germes potentiellement pathogènes. La contamination se produit habituellement lors de la collecte et/ou du conditionnement. Des antibiotiques font partie des dilueurs utilisés pour contrôler la contamination bactérienne, et leur nature et concentration sont édictées par le gouvernement. Le phénomène d'antibiorésistance croissante rend leur utilisation superflue ; il convient donc de trouver des alternatives garantissant une semence de bonne qualité bactériologique.

Le renforcement des mesures d'hygiène et le suivi régulier de l'état de santé génitale des taureaux des centres d'amélioration génétique sont indispensables pour contrôler le risque de contamination simultanée d'un grand nombre de femelles, dans le cas où la semence serait contaminée. Les moyens diagnostiques ainsi que la liste des pathogènes recherchés devraient être élargis.

Remerciements

Les auteurs remercient tout le personnel du Centre d'Amélioration Génétique et du Service de Microbiologie de l'ENMV de Sidi Thabet pour leur aide inestimable durant ce travail.

5. Références

- Corbeil LB, Woodward W, Ward ACS, Mickelsen WD et Paisley L, 1985.** Bacterial interactions in bovine respiratory and reproductive infections. *Journal of Clinical Microbiology*, 21(5):803-7.
- Dion WM, 1979.** The origin and species of yeasts in commercial preparations of bovine semen. *Can. J. Comp. Med*, 1979 Jan; 43(1): 16–21.
- Fish NA, Rosendal S et Miller RB, 1985.** The Distribution of Mycoplasmas and Ureaplasmas in the Genital Tract of Normal Artificial Insemination Bulls. *Can Vet J*. 1985: Jan; 26(1): 13–15.
- Gerard O et Khireddine B, 2002.** Production de Semence Bovine - Didacticiel de Maîtrise de La Reproduction Des Bovins. Vol. 73 p.
- Grout BW et Morris GJ, 2009.** Contaminated liquid nitrogen vapour as a risk factor in pathogen transfer. *Theriogenology* 71 (2009) 1079–1082.
- Gunsalus IC, Salisbury GW et Willet EL, 1941.** The Bacteriology of Bull Semen. *Journal of Dairy Science*. November 1941, Volume 24, Issue 11, Pages 911–919.
- Kilburn C, Rooks DJ, McCarthy AJ et Murray RD, 2013.** Antimicrobial Resistance in Some Gram-Negative Bacteria Isolated from the Bovine Ejaculate. *Reprod Dom Anim* 48, 525–528 (2013); doi: 10.1111/rda.12127.
- Najjar A, Ben Saïd S, Benaoun B, Ezzaouia M, Sattouri J, Ben Mrad M et Messadi L, 2010.** Bacteriology of Frozen-Thawed Semen of Tunisian Arab Stallions. *Journal of Reproduction and Infertility* 1 (3): 62-65, 2010.
- Parez N, 1985.** The most important genital diseases of cattle (control, treatment and the hygiene of semen collection). *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 1985, 4 (1), 69-87.
- Smole I, Thomann A, Frey J, Perreten V, 2010.** Repression of common bull sperm flora and in vitro impairment of sperm motility with *Pseudomonas aeruginosa* introduced by contaminated lubricant. *Reprod Dom Anim*, 45 : 373-742.
- Thibier M et Guérin B, 2000.** Hygienic aspects of storage and use of semen for artificial insemination. *Animal Reproduction Science* 62 _2000. 233–251.
- Wentink GH, Frankena K, Bosch JC, Vandehoek JED, Van der Berg Th, 2000.** Prevention of disease transmission by semen in cattle. *Livestock Production Science*, 62: 207-220.