

UNIVERSITE PARIS VAL DE MARNE
AVENUE DU GÉNÉRAL DE GAULLE 94010 CRETEIL CEDEX

INSTITUT D'ELEVAGE ET DE MEDECINE VETERINAIRE DES PAYS TROPICAUX
10, RUE PIERRE CURIE - 94704 MAISONS- ALFORT CEDEX.

DIPLOME D'ETUDES SUPERIEURES SPECIALISEES : DEVELOPPEMENT DES PRODUCTIONS
ANIMALES EN REGIONS CHAUDES;

RAPPORT DE STAGE

ETUDE QUANTITATIVE DE LA CONTAMINATION BACTERIENNE DU SPERME
ET DE LA SEMENCE DES TAUREAUX REPRODUCTEURS.

PAR MICHEL FACHE

ANNÉE SCOLAIRE 1982 - 1983.

SOMMAIRE

Remerciements.

I. INTRODUCTION

II. CONTAMINATION BACTERIENNE DU SPERME ET DE LA SEMENCE: BILAN DES CONNAISSANCES ACTUELLES.

- 2.1. Germes pathogènes de la semence de taureau : définition
- 2.2. Origine de la contamination bactérienne du sperme de taureau
 - 2.2.1. Contamination des voies génitales du reproducteur.
 - 2.2.2. Sources de contamination extérieure au sperme.
 - 2.2.3. Essais d'obtention d'un sperme aseptique.
- 2.3. Evolution de la contamination bactérienne au cours du conditionnement de la semence.
 - 2.3.1. Effet de la dilution
 - 2.3.2. Effet de la congélation

III. MATERIEL ET METHODES.

- 3.1. Protocole général de l'étude.
- 3.2. Collecte et conditionnement de la semence
 - 3.2.1. Entretien et collecte des taureaux
 - 3.2.2. Préparation des dilueurs et dilution
 - 3.2.3. Mise en paillettes et congélation.

3.3. Technique de dénombrement des microorganismes

3.3.1. Dénombrement sur le sperme frais

3.3.2. Dénombrement sur la semence en paillettes

3.3.3. Dénombrement sur les dilueurs

IV. RESULTATS.

4.1. Contamination bactérienne du sperme et de la semence

4.2. Effets de la dilution et de la congélation

4.2.1. Dilution

4.2.2. Congélation

V. DISCUSSION

VI. CONCLUSIONS

VII. RESUME

VIII. BIBLIOGRAPHIE

IX. ANNEXES

- 2 -

Je voudrais remercier particulièrement,

Monsieur le Docteur Vétérinaire M. PAREZ, Directeur du Laboratoire pour le Contrôle des Reproducteurs, qui a accepté de patronner notre travail;

Monsieur Bernard GUERIN, responsable du Service de Bactériologie - Sérologie au Laboratoire pour le Contrôle des Reproducteurs, qui a mis en place le protocole d'étude;

Madame RAMBAUD, du Service de Bactériologie - Sérologie au Laboratoire pour le Contrôle des Reproducteurs, pour la préparation des milieux de culture et des réactifs nécessaires à l'étude;

Monsieur Louis DENIS, Directeur, Monsieur Philippe DENIS, Chef de Centre, et le personnel du Centre d'Elevage et d'Insémination Artificielle, qui ont accepté de me recevoir et de m'intégrer à leur travail.

I. INTRODUCTION.

La maîtrise de la reproduction et l'utilisation de l'insémination artificielle permettent une démultiplication du potentiel génétique des reproducteurs mâles et assurent ainsi le développement génétique des troupeaux des pays industrialisés.

Les échanges internationaux de semences sélectionnées qui induisent une diffusion plus large du potentiel génétique sont soumis à des exigences commerciales et sanitaires susceptibles d'assurer à l'utilisateur une efficacité sur le plan génétique et une innocuité sur le plan de la santé de ses animaux.

La présente étude a pour objet de quantifier la contamination bactérienne du sperme et de la semence de taureau, lors de la collecte, au cours de son conditionnement et de sa conservation, dans le cas particulier d'un Centre d'Insémination Artificielle, et de contribuer ainsi à apprécier les conséquences d'une exigence sanitaire relative à la contamination bactérienne de la semence sur la commercialisation des semences.

Nous ferons tout d'abord le bilan des connaissances sur la contamination bactérienne du sperme pour préciser son influence sur les fonctions de reproduction. Puis, après avoir présenté notre protocole d'étude, nous commenterons les résultats obtenus.

II. CONTAMINATION BACTERIENNE DU SPERME ET DE LA SEMENCE: BILAN DES CONNAISSANCES ACTUELLES.

2.1. Germes pathogènes de la semence de taureaux: définition.

Par germe pathogène de la semence, on entend tout germe susceptible de se trouver dans ou sur la dose de semence diluée ou congelée, et dont la présence constitue un risque d'infection pour la femelle inséminée et/ou les animaux domestiques de la région où elle se trouve.

Cette définition englobe aussi bien les germes excrétés par l'animal producteur de semence que les divers agents infectieux provenant du milieu extérieur.

Parmi ces germes, on distingue:

- des germes spécifiques, - à tropisme rarement génital (virus aphteux, mycobactéries)
 - à tropisme non exclusivement génital et responsables d'avortements (Brucella, Leptospira, Salmonella, Listeria, ...)
 - à tropisme très marqué ou exclusif pour l'appareil génital (Campylobacter, Trichomonas)

Ces germes peuvent être suspectés puis recherchés et décelés par un examen clinique, des recherches bactériologiques ou des tests allergiques et sérologiques; les géniteurs contaminés peuvent alors être écartés et faire l'objet d'une thérapeutique. Les exigences de la législation sanitaire jointes à une surveillance sanitaire périodique des géniteurs en service limitent grandement l'incidence de ces germes.

- des germes non spécifiques, sans tropisme particulier pour l'appareil génital, qui ne se prêtent à aucun test d'identification sérologique spécifique et qui, du fait de leur évolution souvent indécidable cliniquement présentent un certain danger. Certains d'entre eux sont trouvés dans la semence de taureaux ne présentant ni troubles cliniques, ni baisse de qualité du sperme.

Leur dépôt dans les voies génitales pourraient entraîner diverses inflammations du tractus et de l'infécondité, encore que fasse défaut la preuve expérimentale irréfutable de leur effet suite à l'emploi de sperme contaminé. L'effet

sur l'activité des spermatozoïdes semble varier selon la nature des germes (Marinov P. (8)); certains microorganismes (*Chromobacterium amethystum*, *Bacillus prodigiosus*) exercent une action défavorable sur l'activité vitale des spermatozoïdes et réduisent leur durée de survie.

2.2. Origine de la contamination bactérienne du sperme de taureau

Il a été établi qu'au niveau d'un éjaculat, le nombre de microorganismes varie dans de très larges limites: de $1,5 \cdot 10^4$ selon Ognjanov à $3,0 \cdot 10^8$ selon Salisbury (cité par Marinov (8)).

Grâce à l'application d'une série de mesures d'hygiène dans toutes les étapes du processus de production de la semence, et grâce à l'utilisation d'un appareillage stérilisable construit spécialement pour la collecte du sperme, il paraît possible de diminuer l'indice microbien du sperme; certains auteurs ont obtenu pour certains taureaux du sperme stérile pendant 4-6 mois (Marinov (8) et Balachov (2)).

2.2.1. Contamination des voies génitales du reproducteur

Ruebke (11) a étudié le tractus génital de 45 taureaux, afin de déterminer et de localiser les microorganismes pouvant s'y trouver. Aucun germe n'a été trouvé dans les testicules, les épididymes, l'ampoule déférentielle, les vésicules séminales, la prostate, le bulbe urétral des 45 animaux.

Par contre, la lumière de l'urètre était généralement contaminée soit en arrière de la prostate (9 animaux), soit dans la partie pénienne (36 animaux). Le pénis et le prépuce étaient également contaminés par une flore saprophyte identique dans sa nature.

Les germes furent isolés sur des animaux apparemment sains sans aucune lésion macroscopique imputable.

2.2.2. Sources de contamination extérieure au sperme

Du point de vue technique, l'obtention du sperme est un processus complexe auquel participe toute une série d'éléments en présence desquels le sperme entre en contact avec le milieu ambiant dans lequel le facteur microbiologique est représenté avec un degré d'intensité différent.

La détermination du rôle de ces éléments dans la contamination du sperme est importante et les principales recherches microbiologiques ont porté sur les éléments suivants :

- l'air dans les étables, la salle d'accouplement et le laboratoire
- les eaux de lavage du prépuce des taureaux de reproduction élevés dans différentes conditions d'hygiène
- l'appareillage servant à l'obtention et à la conservation du sperme
- les dilueurs et leurs différentes conditions de préparation
- l'azote liquide assurant la conservation et le stockage des doses de semence.

Ces données étudiées par Marinov (8), montrent que l'indice microbien du sperme, recueilli par la méthode du vagin artificiel tend à baisser de façon marquée quand la teneur en bactéries diminue dans le milieu où sont élevés les taureaux de reproduction. L'indice microbien du sperme est le plus bas chez les taureaux élevés en pâturage.

La contamination de la cavité préputiale varie de la même façon; chez les taureaux âgés, l'indice microbien du prépuce se rapproche de celui de l'air de l'étable, et ce pourrait être la conséquence de la diminution de tonus de l'orifice du prépuce (8).

La valeur de l'indice microbien de l'appareillage utilisé pour l'obtention du sperme varie en fonction des conditions dans lesquelles est conservé cet appareillage après la stérilisation. (8)

Le nombre de bactéries dans les dilueurs diminue lors de l'utilisation de ballons à col étroit et lorsqu'ils sont maintenus fermés après chaque manipulation (8). L'indice microbien de l'air des lieux de travail (salle d'accouplement et laboratoire) diminue en l'absence de communications avec l'étable. Il existe une relation entre la quantité et la composition spécifique de la microflore dans l'air des étables, de la salle d'accouplement et du laboratoire d'une part, et dans le sperme et les diluants d'autre part (8).

Les recherches effectuées (Marinov et Bohnel (7)) sur des échantillons de laïciphos et de jaune d'oeuf de poule frais, utilisés pour la préparation des dilueurs, ont montré que ces constituants jouent un rôle dans la contamination des dilueurs.

Le nombre initial de bactéries dans un sachet de Laiciphos peut varier de 5 à 80 par ml (7); la présence de tels microorganismes est importante car ils peuvent d'une part exercer une action sur les spermatozoides, et d'autre part modifier les propriétés du Laiciphos.

La contamination bactérienne du jaune d'oeuf peut varier de 0 à $1,2 \cdot 10^5$ et dépend de l'état de propreté de la coquille (7).

La contamination des paillettes est variable en fonction des sacs, de leur couleur et de leurs manipulations; elle varie de 8,000 à 300,000 bactéries par paillette (7).

De même, la contamination des sacs de poudre polyvinylique est variable en fonction des sacs et de la couleur; elle varie de 0 à 200,000 bactéries par gramme (7).

La contamination des bouchons de coton varie de 0 à 30,000 bactéries par bouchon (7).

Il semble que le stockage dans l'azote liquide puisse permettre la transmission de certaines bactéries de paillettes contaminées à des paillettes saines. (Marinov et Bohnel (7); Bartlett (D.E.): (4)); cette transmission dépend de la concentration bactérienne du matériel utilisé introduit dans la cuve.

2.2.3. Essais d'obtention d'un sperme aseptique

La mise en évidence dans le sperme de microorganismes ayant une action spermicide et l'effet peu sûr des antibiotiques utilisés à l'égard de certains microorganismes (8) a nécessité l'amélioration des conditions d'hygiène et de l'obtention du sperme.

Marinov (8), grâce à l'application simultanée d'un ensemble de mesures d'hygiène et l'utilisation d'un appareillage stérile a pu réduire la contamination bactérienne du sperme des taureaux de 2060 à 31.630 fois. L'effet de la sécrétion urétrale avant la mise en place du vagin artificiel, donc de l'éjaculation, réduit la contamination bactérienne du sperme de 15 à 60 fois (8). La désinfection de la salle d'accouplement avec une solution de Lysol à 2% est susceptible de purifier l'air jusqu'à 95% (8).

La désinfection du prépuce avec un agent de désinfection testé, reconnu actif sur la microflore et appliqué pendant 4-5 jours (Chloramphénicol; Tétracycline, Acriflavine, Pénicilline+ Streptomycine) permet d'abaisser

l'indice microbien de la cavité préputiale et du sperme (16 et 8). Ainsi, selon ces auteurs, il serait possible d'obtenir un sperme stérile pendant quelques mois pour certains taureaux (8).

Selon Marinov (8), le procédé le plus efficace pour le maintien de la stérilité des vagins artificiels consiste à stériliser la verrerie, puis à conserver ces éléments entièrement montés à 45-50°C dans un appareillage prévu à cet effet.

L'exposition de paillettes manipulées sous un faisceau horizontal de lumière ultra-violette permet de réduire leur contamination, mais non de les stériliser (7).

Par suite de l'existence de possibilités multiples de contamination du sperme au cours des différentes étapes de son traitement, et par suite de l'influence défavorable de certaines espèces de microorganismes sur les spermatozoïdes, il reste indispensable de procéder à un contrôle bactériologique systématique du processus d'obtention du sperme en vue d'améliorer en temps voulu les conditions d'hygiène des étapes au cours desquelles le sperme est contaminé.

2.3. Evolution de la contamination bactérienne de la semence au cours de son conditionnement.

2.3.1. Effet de la dilution

La présence d'antibiotiques (Pénicilline + Streptomycine 1 $\bar{M}$ 1g/litre) dans le dilueur permet de diminuer l'indice microbien du sperme. Néanmoins, selon Balachov (2), cette précaution ne permet pas d'éliminer totalement les germes pathogènes.

Les antibiotiques utilisés pour la conservation du sperme exercent une action différente suivant l'intensité de la contamination, le caractère de la microflore, la durée de conservation du sperme.

D'après Marinov (8), il existerait une relation inverse entre l'effet bactéricide des antibiotiques dans le sperme et la survie des spermatozoïdes.

L'action des antibiotiques présents dans le dilueur est différente selon que les germes proviennent du sperme, des jaunes d'oeufs ou du sachet de Laiciphos.

Après une exposition de 6 heures à 4°C, la contamination du contenu des sacs de Laiciphos est modifiée: environ 45,5 % des sacs sont alors stériles et le nombre de microorganismes a considérablement diminué. (7).

L'effet des antibiotiques du dilueur sur les germes contenus dans le jaune d'oeuf dépend de leur résistance, de leur nombre initial et du temps de contact. Le meilleur résultat est obtenu lorsque les antibiotiques sont adjoints aux jaunes d'oeufs 24 heures avant l'utilisation du dilueur (7).

Un certain nombre de germes, présents dans le sperme et dans le jaune d'oeuf ont montré une résistance aux antibiotiques du Laiciphos. Pour un même germe, cette résistance peut être différente selon qu'il provient du sperme et du jaune d'oeuf. La résistance d'un certain nombre de souches bactériennes présentes dans le jaune d'oeuf pourrait provenir de traitements mal conduits avec de la pénicilline, de la streptomycine, de la terramycine dans les poulaillers. La résistance d'un certain nombre de souches bactériennes présentes dans le sperme pourrait provenir de la même façon d'une adaptation des microorganismes à la pénicilline et à la streptomycine suite aux désinfections du prépuce avec ces antibiotiques (7).

La présence de souches résistantes aux antibiotiques contenus dans le Laiciphos au niveau du jaune d'oeuf devrait imposer soit un contrôle bactériologique préventif et l'élimination des oeufs contaminés, soit une stérilisation du dilueur par chauffage à 65°C.(7)

Selon Balachov (2), la simple exposition à une température de +4°C ne fait pas chuter le nombre de corps microbiens du sperme. La diminution du nombre de ces corps microbiens au cours de la dilution et de l'équilibration serait donc due à l'action des antibiotiques du dilueur.

2.3.2. Effet de la congélation

Selon Balachov (2), la congélation de la semence à -196°C préserve les bactéries.

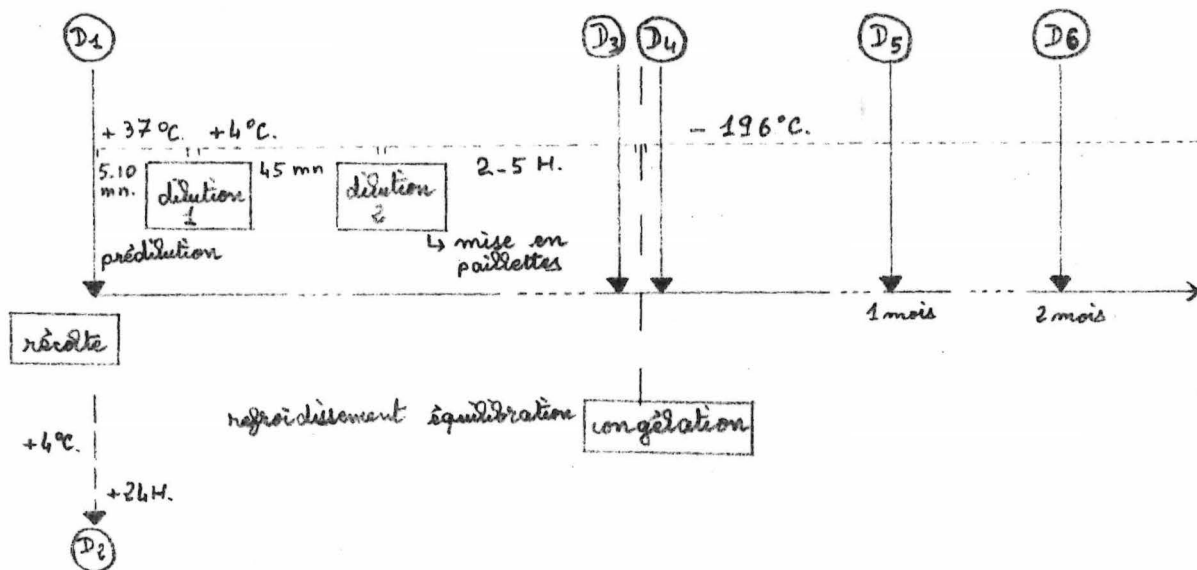
Au cours du stockage dans de l'azote liquide contaminée, la contamination des paillettes de semence est possible (Bartlett (D.E.);(4)).

III. MATERIEL ET METHODES.

3.1. Protocole général de l'étude.

Pour chaque éjaculat retenu, nous évaluerons le nombre de bactéries présentes par millilitre sur le sperme frais puis sur la semence à chaque étape de son conditionnement par prélèvement, dilution et mise en culture d'une fraction connue du milieu initial.

Il s'agit d'une étude quantitative, par conséquent, les différentes espèces bactériennes ne seront pas identifiées.



D₁ : étude de la contamination bactérienne du sperme frais

D₂ : étude de la contamination du sperme frais conservé 24 heures à +4°C
(non réalisé).

D₃ : étude de la contamination de la semence avant congélation, après dilution et équilibration.

- D₄ : étude de la contamination de la semence après congélation
D₅ : étude de la contamination de la semence 1 mois après congélation
D₆ : étude de la contamination de la semence 2 mois après congélation.

Ce protocole doit ainsi permettre de déterminer, préciser et étudier l'influence des conditions de préparation de la semence (manipulation, dilution, équilibration), de la congélation et du stockage dans l'azote liquide sur la contamination bactérienne des doses utilisées en insémination artificielle.

Nous allons tout d'abord préciser les étapes de préparation de la semence dans le cas particulier d'un Centre d'Insémination Artificielle de la région parisienne.

3.2. Collecte et conditionnement de la semence

3.2.1. Entretien et collecte des taureaux

Trente six taureaux de race frisonne et dix sept de race holstein sont logés pour 30 d'entre eux sous une stabulation sur aire paillée, pour 6 en box et pour les autres en plein air sur aire paillée. Les animaux sont maintenus à l'attache toute l'année. Les boxes sont curés chaque jour. Les autres emplacements sont paillés chaque jour et curés tous les 3-4 mois.

Outre la paille de litière, la ration quotidienne se compose de 12 Kg de foin, de 3 Kg de concentré à base de son, avoine et tourteau d'arachide, et de 200 gr d'un complément minéral vitaminé, ce qui assure un rapport protido-fourrager de l'ordre de 100 g MAD/UF.

Aucune pathologie particulière n'est notée.

Les taureaux sont collectés deux fois par semaine. La collecte a lieu dans une salle de récolte nettoyée après chaque utilisation. Chaque taureau est habituellement collecté deux fois à 10 mn d'intervalle après présentation à un boeuf boute-en-train et deux fausses montes. Un même vagin artificiel est utilisé pour les deux sauts.

Les vagins sont nettoyés au savon et à l'eau chaude après chaque collecte et la veille de la récolte, ils sont désinfectés à l'aide d'un écouvillon de coton imprégné d'alcool à 60° et entreposés horizontalement sur une paillasse face à la porte du laboratoire, à l'air libre.

Les tubes de collecte sont lavés et stérilisés en chaleur sèche (2 heures à 170°C) comme toute la verrerie, puis maintenus non bouchés à l'étuve à 37°

Avant chaque récolte, l'inséminateur monte le tube de collecte sur le vagin qui est ensuite vaseliné à l'aide d'une canne de verre maintenue sur la paillasse. Il transporte le vagin du laboratoire vers la salle de collecte, puis le ramène aussitôt le saut effectué. Il transmet alors le tube de collecte au chef de centre qui prélève avec une pipette stérile une goutte de sperme pour en estimer la qualité: motilité massale au microscope, concentration au photocolorimètre. Le tube de collecte bouché est ensuite placé au bain marie à 37°C pendant environ 10 minutes jusqu'au moment de la première dilution.

3.2.2. Préparation des dilueurs et dilution

Les dilueurs sont préparés la veille du jour de collecte selon le protocole ci après:

DILUEUR 1	DILUEUR 2
2 sachets Laiciphos 478 + 800 ml eau bidistillée stérile	2 sachets Laiciphos 478 + 800 ml eau bidistillée à 47°C stérile
+ 200 ml eau bidistillée + 100 ml jaune d'oeuf	+ 200 ml eau bidistillée + 100 ml jaune d'oeuf à 50°C
= 1100 ml de mélange	= 1100 ml de mélange
+ 3% glycérol = 33 ml	+ 11 % Glycérol = 121 ml à 60°C

Le matériel utilisé est stérilisé en chaleur sèche pendant 2 heures à 170°C excepté le séparateur blanc/jaune d'oeuf qui est en plastique dur.

Les opérations de préparation sont effectuées proprement mais non stérilement. Le second dilueur est placé au réfrigérateur à $+4^{\circ}\text{C}$ dans un récipient bouché dès la fin de sa préparation.

Le premier dilueur est placé dans un récipient non bouché dans une enceinte close où il se refroidit à la température ambiante. Juste avant la récolte, sa température est portée à 37°C . Il est ensuite transvasé dans des biberons stériles non bouchés maintenus à 37°C dans un bain-marie, dans lequel s'effectue la première dilution du sperme.

La semence, conservée dans un biberon bouché, est placée dans une enceinte réfrigérante où elle se refroidit de 37°C à $+4^{\circ}\text{C}$ en 45 minutes environ. La seconde dilution a alors lieu à cette température.

La pipette servant à la première dilution est stérilisée avant chaque récolte. Elle est placée dans un biberon contenant le premier dilueur au-dessus du bain-marie. Les éprouvettes servant à la seconde dilution sont stérilisées puis maintenues à $+4^{\circ}\text{C}$ en enceinte réfrigérée.

3.2.3. Mise en paillettes et congélation

Les paillettes vides sont conditionnées en sacs de mille unités, scellés par le fabricant. Elles sont identifiées par impression d'informations à leur surface: nom du taureau, centre producteur, année et jour de collecte. Elles sont ensuite placées manuellement à cet effet dans une machine à imprimer, puis recueillies dans un récipient en plastique dur. Elles sont alors regroupées manuellement en faisceaux de 20 unités et placées à $+4^{\circ}\text{C}$ dans un récipient en plastique dur.

La mise en paillettes est manuelle. Chaque semence est versée dans un petit récipient en plastique souple (conservé dans un récipient fermé au laboratoire). Successivement l'extrémité libre des 20 paillettes de tous les faisceaux est trempée dans la semence qui est aspirée par une pompe à vide reliée par une tubulure à l'autre extrémité des paillettes.

Les paillettes sont ensuite bouchées par un bouchon de poudre polyvinyle et placées dans de l'eau à $+4^{\circ}\text{C}$ pendant au moins deux heures.

Elles sont ensuite essuyées, disposées dans un présentoir et placées dans la cuve à congélation à -20°C . En 9 minutes, la température s'abaisse en-dessous de -170°C et les paillettes sont alors stockées dans l'azote liquide.

De ce procédé de fabrication, nous ferons les observations suivantes:

- le grand nombre de manipulations de la semence et des paillettes jusqu'à la mise en place du bouchon isolant la dose de semence. Ces interventions sont réalisées proprement mais non stérilement. Nous reviendrons plus loin sur toutes les possibilités de contamination extérieure à la semence.
- la standardisation relative des étapes de la préparation de la semence. La première dilution peut s'effectuer de 3 à 20 minutes après la collecte; la seconde dilution de 30 minutes à 3 heures après la première; le temps d'équilibration peut durer de 2 à 5 heures. Sans que l'on puisse en mesurer l'effet et l'importance, la variation de ces intervalles de temps qui conditionnent probablement la multiplication des bactéries et l'action des antibiotiques de la semence est à relever.

3.3. Technique de dénombrement.

Le dénombrement sera réalisé après ensemencement d'un milieu de culture défini, coulé en boîtes de Pétri, avec une quantité connue des dilutions décimales de l'échantillon de semence en essai, puis incubation de ces boîtes pendant 72 heures à 37°C en aérobiose.

Gélose pour dénombrement

* composition.

Tryptone.....	5,0 g
Extrait de levure déshydraté....	2,5 g
dextrose anhydre.....	1,0 g
Agar-agar en paillettes.....	18 g
eau distillée.....	1000 ml

* préparation.

Les composants sont dissous dans l'eau à ébullition, puis le milieu est réparti dans des tubes à essais à raison de 15 ml par tube. Le tout est stérilisé à l'autoclave à 121°C pendant 20 minutes.

Avant de commencer l'examen microbiologique, les géloses sont placées au bain marie bouillant, puis refroidies à 45°C dans un second bain-marie.

Les géloses sont alors additionnées stérilement par tube de 15 ml de:

- 0,75 ml de sérum de veau stérile décomplémenté (5%)
- 0,75 ml d'extrait globulaire stérile (5%).

Le mélange est ensuite agité puis conservé avant ensemencement au bain-marie à 45°C. Les géloses utilisées pour le dénombrement bactérien de la semence en paillettes sont additionnées de 0,075 ml de polyanéthol sulfonate de sodium (S.P.S. 0,05 %) utilisé comme inactivateur des antibiotiques présents dans le dilueur.

Les dilutions sur le sperme frais (D₁) ou à partir de la semence en paillettes (D₃, D₄, D₅, D₆) sont alors réalisées.

Diluant: eau peptonnée tamponnée

* composition

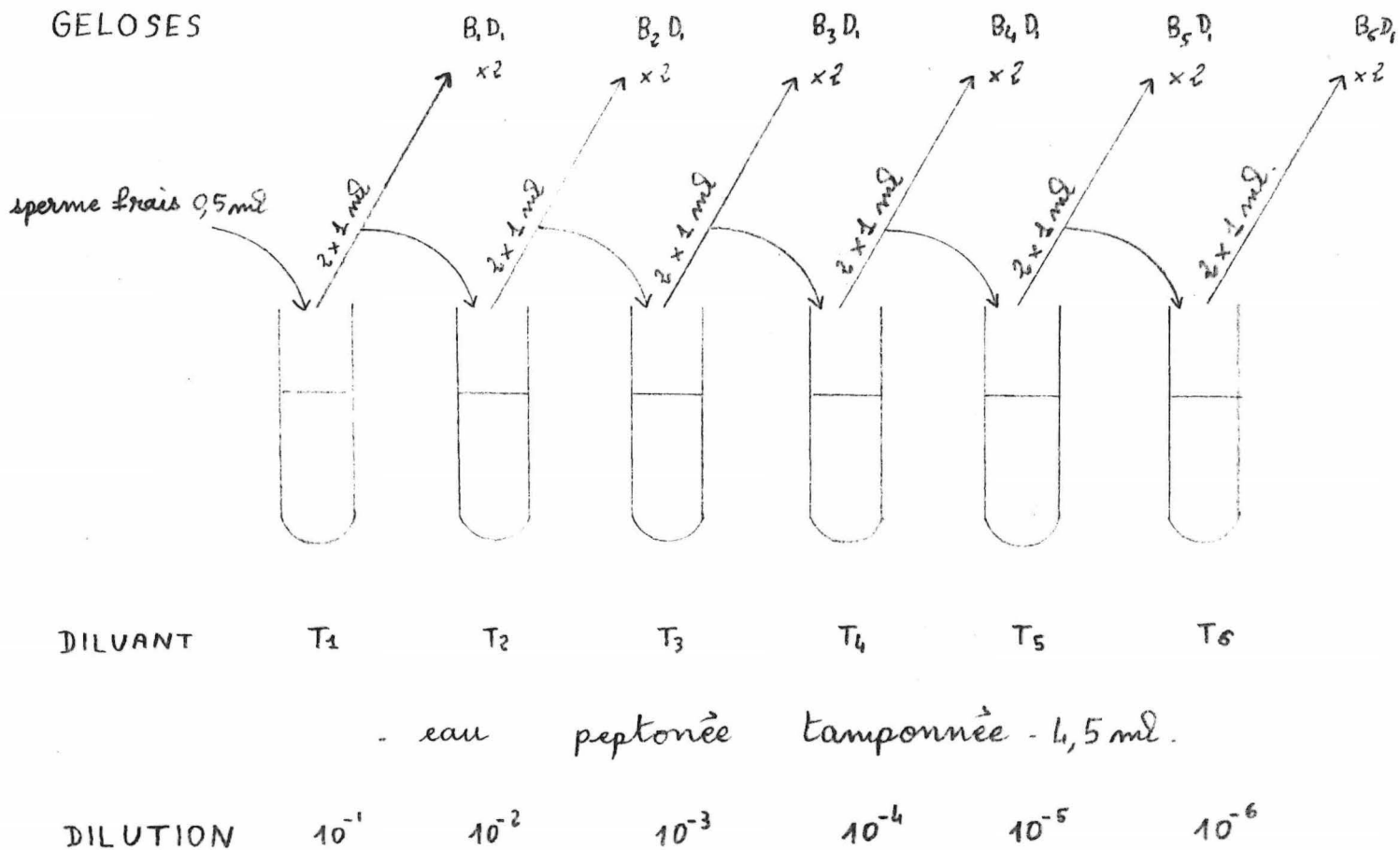
peptone.....	10,0 g
chlorure de sodium.....	5,0 g
Na ₂ H PO ₄ , 12 H ₂ O.....	9,0 g
KH ₂ PO ₄	1,5 g
Eau distillée	1000 ml

* préparation

Dissoudre les composants dans l'eau. Répartir les quantités de diluant nécessaires dans des tubes à essais: 1,8 ml - 4,5 ml. Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 20 minutes.

3.3.1. Dénombrement sur le sperme frais

- prélever 0,6 ml de sperme frais juste après la récolte
- introduire 0,5 ml de sperme dans un tube T₁ de diluant de 4,5 ml (dilution 10⁻¹) avec une pipette stérile.
- agiter 30 secondes au whirlmix.
- prélever 2 x 1 ml de la dilution 10⁻¹ avec une pipette stérile.
- introduire 0,5 ml de la dilution 10⁻¹ dans un tube T₂ de diluant et deux fois 0,5 ml dans 2 tubes de gélose.
- rejeter 0,5 ml.
- agiter les géloses par retournement.
- couler stérilement les géloses dans 2 boîtes de Pétri de 10 cm de diamètre.
- laisser les géloses solidifier.
- sécher les boîtes et les incuber 72 heures à l'étuve à 37°C.
- répéter l'opération sur les 6 tubes de dilution T₁ à T₆ qui correspondent aux dilutions 10⁻¹ à 10⁻⁶.



3.3.2. Dénombrement sur la semence en paillettes

- décongeler une paillette (D₄, D₅, D₆ seulement) en la plongeant dans l'eau à 37°C pendant une minute. La sortir puis la sécher.
- identifier la paillette
- désinfecter les extrémités avec de l'alcool à 95°C
- couper les extrémités de la paillette en la maintenant en position horizontale.
- ouvrir un tube de diluant T₁ de 1,8 ml stérilement et y laisser couler le contenu de la paillette (dilution 10^{-1})
- agiter 30 secondes au whirlmix
- prélever 1,7 ml avec une pipette stérile
- introduire 0,5 ml dans un tube de diluant T₂ de 4,5 ml (dilution 10^{-2}) et deux fois 0,5 ml dans 2 tubes de géloses avec SPS.
- couler stérilement les géloses, les sécher et les incub.
- réaliser ainsi 4 dilutions successives.

3.3.3. Dénombrement sur les dilueurs

- pour chaque lot de fabrication, prélever 2 x 1 ML de dilueur et introduire dans 2 tubes de gélose avec SPS
- couler les géloses, les sécher et les incub.

3.3.3. Dénombrement sur les dilueurs

- pour chaque lot de fabrication, prélever 2 fois 1 ml de dilueur et introduire dans 2 tubes de gélose avec SPS.
- couler les gélases, les sécher et les incubes.

Après la période d'incubation, il est procédé au comptage des colonies. Ne sont retenues pour le dénombrement que les boîtes ne contenant pas plus de 300 colonies.

Quand il existe au niveau d'une même dilution, 2 boîtes contenant entre 30 et 300 colonies (ou une boîte contenant entre 30 et 300 colonies et l'autre moins de 30 colonies), ou quand au niveau de la première dilution les 2 boîtes contiennent moins de 300 colonies, la somme de ces 2 nombres est multipliée par l'inverse du taux de dilution, en ne gardant que 2 chiffres significatifs, pour obtenir le nombre de bactéries par millilitre.

Quand il n'existe aucune colonie au niveau de la première dilution dans chacune des deux boîtes, le résultat est donné sous la forme ; moins de 10 bactéries par millilitre puisque la solution mère a été diluée au 1/10è.

IV. RESULTATS.

Nous avons pu réaliser l'expérimentation sur 40 éjaculats correspondant à 18 taureaux différents. Ces 40 éjaculats correspondent à des spermes de bonne qualité et qui, à ce titre ont donné lieu à une mise en paillettes.

Nous devons remarquer que l'expérimentation sur le sperme frais correspond à un seul éjaculat. Par contre, l'expérimentation peut porter sur cet éjaculat unique ou sur le mélange des éjaculats des 2 sauts successifs si chacun d'eux s'est révélé de bonne qualité.

Nous avons donc été amené dans ce travail à comparer la contamination de 2 éjaculats successifs pour un même taureau.

L'ensemble des tableaux de chiffres sont regroupés en annexes.

4.1. Contamination bactérienne du sperme et de la semence.

La contamination bactérienne du sperme à l'émission se trouve

comprise entre $3,6.10^2$ et $1,8.10^7$ bactéries par millilitre. La contamination moyenne est de $1,7.10^6$ bactéries par millilitre.

Pour un même animal, la contamination bactérienne du sperme pour 2 collectes différentes est variable. La variation maximale est observée pour le taureau n° 15 : $3,6.10^2$ et $4,4.10^5$ bactéries par millilitre.

Pour 2 sauts successifs au cours d'une même collecte, la contamination du sperme à l'émission n'est pas reproductible et est sujette à des variations parfois importantes. Dans 5 des 6 cas étudiés, le second éjaculat est plus contaminé que le premier.

Après dilution et équilibration, la contamination bactérienne de la semence se trouve inférieure à $1,2.10^6$ bactéries par millilitre. 9 semences sur 32 présentent moins de 10 bactéries par ml et 19 semences sur 32 présentent moins de 2500 bactéries par ml.

Après 1 mois de stockage dans l'azote liquide, 22 semences sur 24 présentent moins de 2 500 bactéries par ml.

Les dilueurs ont été trouvés "stériles" (moins de 1 bactérie par ml) dans 17 cas sur 22. Par deux fois, la contamination s'est chiffrée à un maximum de 10^3 bactéries par ml. Le premier dilueur est trouvé plus souvent contaminé que le second.

4.2. Effets de la dilution et de la congélation

4.2.1. Dilution

La concentration bactérienne diminue pour tous les lots de semence après la dilution et l'équilibration. On observe un rapport D_1/D_3 variable de l'ordre de 2 à 10^3 . La diminution de la concentration bactérienne de D_1 en D_3 n'apparaît pas être fonction de la concentration initiale; pour des valeurs voisines en D_1 , les valeurs en D_3 peuvent être très différentes.

Il n'est pas douteux que l'identité des germes présents dans chaque éjaculat ainsi que leur sensibilité aux antibiotiques contenus dans le dilueur doivent intervenir pour expliquer ces différences.

Nous avons voulu savoir si la diminution de concentration bactérienne de D_1 en D_3 s'accompagnait ou non d'une diminution effective du nombre total de germes contenus initialement dans le sperme et les deux dilueurs.

Nous avons alors défini x comme étant la concentration bactérienne théorique du sperme frais additionné de la quantité nécessaire de chacun des 2 dilueurs, juste après la collecte. Nous négligeons pour ce faire toutes les contaminations extérieures susceptibles de survenir jusqu'à la mise en place du bouchon des paillettes.

Nous constatons que dans 9 cas sur 32, le nombre total de germes contenus initialement dans le sperme frais et les dilueurs n'a pas chuté mais qu'il a au contraire augmenté au cours de la dilution et de l'équilibration. Remarquons que parmi ces 9 cas, 3 taureaux sont concernés chacun pour 2 éjaculats.

Il nous semble donc possible d'émettre l'hypothèse selon laquelle, l'augmentation au cours de la dilution et de l'équilibration du nombre de germes contenus initialement dans le sperme frais serait due au développement d'une ou plusieurs espèces bactériennes présentes dans l'éjaculat de certains taureaux et résistantes aux antibiotiques contenus dans le dilueur.

Nous constatons parallèlement que l'effet d'une "dilution simple" agissant par une simple augmentation de volume n'est pas négligeable. Le taux de dilution variant de 15 à 35, la concentration des bactéries dans la semence diminue d'autant lors de la dilution, dans la mesure où chacun des 2 dilueurs est stérile. Le taux de dilution étant fonction de la qualité du sperme (motilité massale et densité, auxquels il faut adjoindre la résistance à la congélation, facteur propre au taureau), on peut donc dire que la qualité du sperme influence favorablement la faible contamination bactérienne de la semence en paillettes. Pour une même contamination bactérienne, le sperme de meilleure qualité permettra de produire des paillettes moins contaminées.

4.2.2. Congélation

Après la congélation, la concentration bactérienne de la semence diluée et équilibrée s'est révélée être stable dans 9 cas, diminuer dans 16 cas et augmenter dans 6 cas. Ces résultats contradictoires nous ont faits supposer que la congélation en tant que telle n'avait pas ou peu d'effet et que les variations de contamination entre D_3 et D_4 résultaient d'une variabilité de contamination inter-paillettes.

Nous constatons que le stockage dans l'azote liquide après congélation entraîne une diminution de la concentration bactérienne quand persiste une

contamination avant la congélation (sauf dans 2 cas).

V. DISCUSSION

Le protocole suivi se révèle satisfaisant quant au nombre de dilutions choisies pour pouvoir apprécier la contamination du sperme et de la semence. Les taux de contamination trouvés sont en accord avec ceux des auteurs consultés. Il n'a pourtant pas été récolté de sperme stérile.

Il ne nous a pas été possible de caractériser la répétitivité, la précision non plus que la limite de sensibilité de la méthode par ailleurs définies dans le cadre de normes internationales appliquées au dénombrement des microorganismes dans divers milieux et donc dans des conditions techniques différentes de celles que nous avons retenues.

Nous constatons une grande variabilité de contamination inter-paillettes, ce qui semblerait indiquer qu'il eût été préférable de ne pas établir un résultat avec une seule dose mais sur plusieurs doses et d'exprimer un résultat comme une moyenne de plusieurs examens. L'organisation de la collecte au Centre d'Insémination fréquenté, la lourdeur du protocole pourtant déjà allégé au maximum, la quantité de produits et de réactifs nécessaires et notamment le nombre de paillettes qui nous auraient été nécessaires pour ces études préliminaires, et enfin le temps relativement limité que nous avons consacré à cette étude ne nous ont pas permis de mener à bien tous les éléments qui auraient été nécessaires à une exploitation maximale des résultats de ce travail.

C'est la raison pour laquelle l'analyse statistique n'a pu porter que sur 4 des taureaux étudiés (n°1, n° 3, n° 4, n° 5) qui possédaient plusieurs résultats pour chaque étape du conditionnement de la semence.

Après transformation logarithmique des concentrations bactériennes, calcul des moyennes logarithmiques et application d'un test de comparaison multiples pour l'analyse statistique, l'interprétation de ces résultats permet d'observer que:

- * la modification de concentration bactérienne entre le sperme frais (D_1) et la semence diluée, équilibrée, immédiatement après congélation (D_{11}) est significative ($p < 1\%$).

- * la modification de la concentration bactérienne entre la semence diluée et équilibrée (D_3) et la semence stockée depuis 1 mois dans l'azote liquide

(D₅) est significative ($p < 0,05$).

* la modification de concentration bactérienne entre la semence diluée et équilibrée (D₃) et la semence juste après congélation (D₄) n'est pas significative.

* la modification de concentration bactérienne entre la semence juste après congélation (D₄) et la semence stockée depuis 1 mois dans l'azote liquide (D₅) n'est pas significative. Cependant il nous semble important d'indiquer que le test est à la limite de la signification et il pourrait être intéressant de vérifier s'il n'est pas possible d'établir une relation significative en augmentant le nombre de données.

Ainsi, contrairement à ce que nous avons pu lire, il semble que la congélation puis le stockage dans l'azote liquide aient pour effet de diminuer la concentration bactérienne de la semence.

Nous remarquons néanmoins l'impossibilité d'établir une relation entre la contamination de la semence congelée en paillettes et la qualité du sperme et/ou la contamination du sperme frais.

contamination du sperme frais	nombre d'éjaculats	nombre de semences présentant moins de 500 bactéries par dose aussitôt après congélation	% de semences présentant moins de 500 bactéries par dose aussitôt après congélation
10 ⁵ x 10 ⁵ bact/ml	12	8	66
10 ⁵ x 10 ⁶ bact/ml	22	14	64
10 ⁶ x 10 ⁷ bact/ml	29	17	58

Ce tableau montre qu'une certaine proportion des spermes les moins pollués fournit des paillettes présentant plus de 500 bactéries par dose et qu'inversement un sperme très pollué ne fournit pas nécessairement des paillettes très contaminées. Ainsi se pose le problème de la détermination d'un témoin de contamination bactérienne pour la semence en paillettes.

VI. CONCLUSIONS.

Nous entendons préciser les contaminations possibles du sperme et de la semence après la récolte afin de mettre en évidence quelques points qui nous semblent devoir être améliorés. Nos critiques et conseils devront être modulés sur le terrain, car, outre l'impact psychologique et financier, il n'est pas sûr qu'une multiplicité de mesures contraignantes apporte un bénéfice notable eu égard à l'importance de la contamination initiale due à l'animal producteur. Il n'en reste pas moins qu'en fonction d'un avenir où la production d'un sperme moins pollué est envisagée, ces mesures doivent être dès lors prises en compte.

La multiplicité des contaminations possibles après la récolte tiennent:

* à la préparation et à la conservation des dilueurs:

Les manipulations, si elles sont réalisées avec propreté, ne sont pas stériles. Le séparateur Jaune/Blanc d'oeuf n'est pas stérilisé. Le premier dilueur est conservé en récipients non bouchés dans l'enceinte du laboratoire, et les constituants qui entrent dans sa composition, oeufs, glycérol, dilueur, ne présentent aucune garantie de stérilité.

* à la manipulation des paillettes

Les paillettes, la poudre polyvinylique des bouchons, les récipients en plastique ne présentent aucune garantie de stérilité. Les paillettes sont manipulées manuellement lors de l'impression et lors de la mise en faisceau. Elles entrent en contact de la machine à imprimer, de la paillasse et des récipients en plastique dur. Il en résulte essentiellement une possibilité de contamination de la surface extérieure des paillettes dont une partie est en contact direct avec la semence lors du remplissage.

* à l'ambiance des locaux

Après avoir collecté un taureau, l'inséminateur revient dans le laboratoire avec des bottes souillées alors que s'y trouvent à l'air libre : le premier dilueur en biberons, les vagins, les paillettes, les thermomètres, la canne à vaseline. La salle de collecte est nettoyée, mais elle n'est jamais désinfectée et trois portes en regard y créent un brassage d'air pollué.

Nous proposerons donc les mesures suivantes:

* l'obtention d'un dilueur stérile : cet impératif nous paraît être le plus

nécessaire. Nous avons vu qu'un dilueur stérile par augmentation du volume de la semence réduit déjà la concentration des bactéries. Il en va tout autrement quand le dilueur est très pollué (10^3 bactéries par ml), la quantité totale de bactéries apportées par le dilueur pouvant alors être supérieure à celles apportées par le sperme! La plus grande propreté, voire la manipulation auprès d'un bec bunsen doit être requise pour la préparation des dilueurs. La conservation du premier dilueur se fera dans un récipient bouché et les dilutions s'effectueront avec un grand soin de rigueur.

* Le respect strict des règles d'hygiène et de propreté dans l'enceinte du laboratoire: l'isolement des paillettes de la paillasse par un papier propre lors de la mise en faisceau nous semble plus rationnel. La désinfection régulière des récipients en plastique recevant des paillettes, l'isolement sous cloche des vagins désinfectés nous semble souhaitable.

Une attention particulière sera donnée à la manipulation des bacs en plastique souple qui entrent en contact direct avec la semence avant le remplissage des paillettes. Il serait d'ailleurs plus rigoureux de les remplacer par des récipients stérilisables. Enfin, il nous paraît fondamental d'éviter par des mesures appropriées les entrées successives dans le laboratoire du technicien chargé des récoltes.

Nous devons également envisager les mesures susceptibles de diminuer le nombre de germes émis par l'animal.

Nous avons observé que la collecte elle-même assurait d'une certaine manière la contamination de la verge et du prépuce:

* lors de la préparation au saut, la verge, sortie du fourreau peut être contaminée par l'ambiance polluée de la salle de collecte. Une collecte réalisée en extérieur ou une désinfection poussée de la salle de monte pourraient y remédier.

* lors des fausses montes prélabiles au saut, il n'est pas rare que le prépuce et la verge entrent en contact avec la partie arrière du boute-en-train. La présence d'un tablier propre sur le boute-en-train pourrait éviter une contamination importante.

* l'emploi d'un même vagin pour deux sauts successifs, dans la mesure où lors du premier saut, l'entrée du vagin est souillée au contact du fourreau,

entraîne la contamination du prépuce et de la verge lors du second saut.

L'emploi d'un vagin lavé et désinfecté pour chaque saut pourrait y remédier.

Un nettoyage de fourreau efficace donc bien fait régulièrement et dont les effets seraient contrôlés périodiquement et bactériologiquement ne nous paraît pas envisageable dans un bref avenir au Centre d'Insémination Artificiel au vu des contraintes créées dans ce but, en temps et en personnel.

Nous conseillerons enfin une meilleure hygiène des aires de couchage, bien que nous n'ayons observé aucune différence significative de contamination bactérienne du sperme pour des taureaux différemment logés, dans nos résultats.

VII. RESUME.

Notre étude quantitative de la contamination bactérienne du sperme et de la semence a porté sur 40 éjaculats de 18 taureaux d'un Centre d'Insémination Artificielle.

La contamination du sperme à l'émission se trouve comprise entre $3,6.10^2$ et $1,8.10^7$ bactéries par millilitre.

La dilution du sperme, l'équilibration après mise en paillettes, la congélation de la semence permettent de réduire la contamination du sperme frais.

Il semble d'autre part que la congélation puis le stockage dans l'azote liquide aient pour effet de diminuer la concentration bactérienne de la semence.

Des mesures sont proposées pour obtenir un dilueur stérile, maintenir l'hygiène dans l'enceinte du laboratoire, rationaliser les opérations de collecte et améliorer l'entretien des taureaux.

VIII. BIBLIOGRAPHIE.

- (1). BANE A. : Diseases of sheep and goats in relation to Artificial Insemination with frozen semen.
Disease control in semen and embryos. 1981. vol.23. 21-28. (Réunion FAO du 23-27 Février 1981).
- (2). BALACHOV : Appréciation sanitaire et standardisation des dilueurs utilisés en insémination artificielle des animaux.
6è Congrès International de Reproduction et Insémination artificielle.
Paris 1968. Vol.2. 989-991.
- (3) BALACHOV, KOUZNETCHNIKOV : Améliorons l'activité des Centres d'Insémination Artificielle.
Elevage. 1968. N° 5. 73-76.
- (4) BARTLETT D.E., LARSON L.L., PARKER W.G., HOWARD T.H. : Specific pathogen free frozen bovine semen : a goal ?
Technical conference on AI and Reproduction. 1976. Milwaukee (Wisconsin).
- (5) BARTLETT D.E. : Bull semen : specific microorganisms
Disease control in semen and embryos. 1981. Vol.23. 29-48.
- (6) CEMBROWICZ H.J., OSBORNE A.D. : The effect of preputial cavity treatment on the number and types of bacteria in semen samples and sheath washings.
Congrès International de Reproduction et Insémination artificielle.
La Haye 1961. Vol. 3. 468-480.
- (7) MARINOV P., BOHNEL H. : Hygienic conditions of materials for freezing bovine semen.
J. Dairy Sci. 1957, Vol 6, 707-711.
- (8) MARINOV P., BALCEV M., ZAGORSKI D. : Etude de la microflore dans le prépuce et le sperme de taureau.
Vetrinarnomedicinski Nauki 1966, Vol 3, (2), 177-186.
- (9) PAREZ M., GOFFAUX M., NIBART M., GUERIN B. : Les infections génitales chez le taureau.
Coll. Sté Nat. Fertilité et Stérilité 1977, 85-102.
- (10) PAREZ M., GUFRIN B. : Sanitary and hygienic procedures for controlling ubiquitous bacteria.
1983. Intern. Symp. on recommended microbiological tests for the international exchange of animal genetic material. Ames IOWA (USA); (sous presse).
- (11) RUEBKE : Bacterial flora of the bovine male genitalia.
Am. J; Vet. Research. Jan. 1951, 12-42.

- (12) VANDEPLASSCHE M.: Diseases with specific or non specific microorganismes in boars in relation to A.I.
Disease control in semen and embryos. 1981, vol. 23, 79-88.
- (13) WIERZSBOWSKI S., PIASECKA, SERAFIN M.: Bacteria translocalisation in pelleted semen by liquid nitrogen.
Fortpfl. Haust. 1970. vol. 6, 365-368.
- (14) WIERZSBOWSKI S.: Bull semen opportunistic pathogen and ubiquitary microflora.
Disease control in semen and embryos. 1981. Vol.23, 21-28.

IX. ANNEXES

- CONTAMINATION BACTERIENNE DU SPERME ET DE LA SEMENCE.

numéros des taureaux	jour de collecte	Pollution de la semence (bact/ml)					Evolution de la pollution de la semence		
		D ₁	D ₃	D ₄	D ₅	D ₆	D ₁ /D ₃	D ₃ /D ₄	D ₃ /D ₅
1	158	$1,6 \cdot 10^5$	<10	<10	10	/	$1,6 \cdot 10^4$	1	1
	165	$7,3 \cdot 10^4$	10	<10	<10	10	$7,3 \cdot 10^3$	1	1
2	158	$8,4 \cdot 10^4$	<10	<10	$6,0 \cdot 10^1$	$2,0 \cdot 10^1$	$8,4 \cdot 10^3$	1	$1,6 \cdot 10^1$
3	158	$5,6 \cdot 10^4$	$4,9 \cdot 10^3$	$2,9 \cdot 10^3$	/	/	$1,1 \cdot 10^1$	1,7	/
	168	$6,6 \cdot 10^5$	$3,2 \cdot 10^2$	$5,9 \cdot 10^2$	10	<10	$2,0 \cdot 10^3$	$5,4 \cdot 10^{-1}$	$3,2 \cdot 10^1$
	210	$1,8 \cdot 10^7$	$1,2 \cdot 10^6$	$1,4 \cdot 10^6$	/	/	$1,5 \cdot 10^1$	$8,5 \cdot 10^{-1}$	/
	231	$4,1 \cdot 10^5$	/	/	/	/	/	/	/
4	158	$1,4 \cdot 10^4$	$7,4 \cdot 10^3$	$4,1 \cdot 10^3$	$3,0 \cdot 10^2$	$2,4 \cdot 10^2$	1,8	1,8	$2,4 \cdot 10^1$
	165	$5,2 \cdot 10^6$	$8,2 \cdot 10^3$	$5,1 \cdot 10^3$	$2,4 \cdot 10^2$	$7,0 \cdot 10^2$	$6,3 \cdot 10^2$	1,6	$3,4 \cdot 10^1$
	168	$2,2 \cdot 10^5$	$4,0 \cdot 10^1$	$3,0 \cdot 10^1$	10	<10	$5,5 \cdot 10^3$	1,3	4,0
5	158	$1,6 \cdot 10^4$	<10	$5,0 \cdot 10^2$	/	/	$1,6 \cdot 10^3$	$2,0 \cdot 10^{-2}$	/
	161	$2,9 \cdot 10^5$	$1,3 \cdot 10^5$	$2,8 \cdot 10^4$	$1,1 \cdot 10^3$	$1,2 \cdot 10^3$	2,3	4,6	10^2
	165	$5,6 \cdot 10^6$	$2,6 \cdot 10^2$	$1,2 \cdot 10^2$	$2,0 \cdot 10^1$	<10	$2,1 \cdot 10^4$	2,1	$1,3 \cdot 10^1$
	168	$5,8 \cdot 10^3$	<10	<10	<10	<10	$5,8 \cdot 10^2$	1	1
	193	$9,4 \cdot 10^4$	<10	/	/	/	$9,4 \cdot 10^3$	/	/
6	158	$5,2 \cdot 10^4$	$8,1 \cdot 10^2$	$6,7 \cdot 10^3$	$5,0 \cdot 10^2$	$6,2 \cdot 10^2$	$6,4 \cdot 10^1$	$1,2 \cdot 10^1$	1,6
	189	$1,4 \cdot 10^5$	/	<10	<10	/	10^3	$1,3 \cdot 10^1$	$1,3 \cdot 10^1$
7	161	$4,6 \cdot 10^4$	/	<10	<10	<10	/	/	/
	207	$1,3 \cdot 10^3$	/	/	/	/	/	/	/
8	161	$1,6 \cdot 10^7$	$2,4 \cdot 10^5$	$2,0 \cdot 10^4$	$1,4 \cdot 10^3$	$1,2 \cdot 10^3$	$6,6 \cdot 10^1$	$1,2 \cdot 10^1$	$1,7 \cdot 10^2$
	189	$2,2 \cdot 10^6$	$3,8 \cdot 10^4$	/	$1,6 \cdot 10^3$	/	$5,7 \cdot 10^1$	/	$2,4 \cdot 10^1$
9	161	$7,5 \cdot 10^5$	$1,0 \cdot 10^2$	$1,8 \cdot 10^2$	<10	$3,0 \cdot 10^1$	$7,5 \cdot 10^3$	$5,5 \cdot 10^{-1}$	10^1
10	165	$1,2 \cdot 10^6$	$3,1 \cdot 10^4$	$5,6 \cdot 10^4$	$1,4 \cdot 10^2$	<10	$3,8 \cdot 10^1$	$5,5 \cdot 10^{-1}$	$2,2 \cdot 10^2$
	193	$2,9 \cdot 10^6$	/	/	/	/	/	/	/
	210	$9,0 \cdot 10^5$	$5,1 \cdot 10^4$	$9,0 \cdot 10^4$	/	/	$1,7 \cdot 10^1$	5,6	/

numéros des taureaux	jour de collecte	Pollution de la semence (bact./ml)					Evolution de la pollution de la semence		
		D ₁	D ₃	D ₄	D ₅	D ₆	D ₁ /D ₃	D ₃ /D ₄	D ₃ /D ₅
11	168	$4,0 \cdot 10^6$	$1,2 \cdot 10^4$	$6,0 \cdot 10^3$	$4,5 \cdot 10^3$	$1,4 \cdot 10^3$	$3,3 \cdot 10^2$	2,0	2,6
12	189	$2,4 \cdot 10^4$	$2,0 \cdot 10^2$	$2,0 \cdot 10^1$	<10	/	$1,2 \cdot 10^2$	10	$2,0 \cdot 10^1$
13	165	$3,4 \cdot 10^6$	$4,1 \cdot 10^2$	$2,7 \cdot 10^2$	$7,0 \cdot 10^2$	10	$8,3 \cdot 10^3$	1,5	$5,8 \cdot 10^{-1}$
	193	$2,7 \cdot 10^3$	/	/	/	/	/	/	/
	207	$6,4 \cdot 10^5$	$1,1 \cdot 10^3$	$8,6 \cdot 10^2$	/	/	$5,8 \cdot 10^2$	1,2	/
14	168	$2,3 \cdot 10^5$	<10	<10	<10	<10	$2,3 \cdot 10^4$	1	1
	189	$1,0 \cdot 10^6$	$1,0 \cdot 10^2$	$1,0 \cdot 10^2$	$8,9 \cdot 10^2$		10^4	1	$1,1 \cdot 10^{-1}$
	193	$7,0 \cdot 10^5$	/	/	/	/	/	/	/
15	189	$6,5 \cdot 10^4$	$1,1 \cdot 10^4$	$2,3 \cdot 10^4$	$7,8 \cdot 10^3$		5,9	$4,7 \cdot 10^{-1}$	1,4
	203	$4,4 \cdot 10^5$	/	/	/	/	/	/	/
	231	$3,6 \cdot 10^2$	<10	<10			$3,6 \cdot 10^1$	1	
16	193	$1,2 \cdot 10^4$	<10	<10	$6,6 \cdot 10^2$		$1,2 \cdot 10^3$	1	$1,6 \cdot 10^{-2}$
17	203	$1,4 \cdot 10^6$	/	/	/	/	/	/	/
	229	$1,4 \cdot 10^5$	$8,8 \cdot 10^3$	$6,1 \cdot 10^3$			$1,6 \cdot 10^1$	1,4	
18	229	$1,5 \cdot 10^5$	<10	<10			$1,5 \cdot 10^4$	1	

CONTAMINATION BACTERIENNE DES DILUEURS DU SPERME.

Jour de collecte	Pollution du premier dilueur (bact./ml)	Pollution du second dilueur (bact./ml)
158	10^3	< 1
161	< 1	< 1
165	2	< 1
168	14	< 1
189	< 1	< 1
193	< 1	< 1
203	< 1	< 1
207	< 1	< 1
210	92	10^3
229	< 1	< 1
231	< 1	< 1

EFFET DE LA DILUTION DE LA SEMENCE.

Numéros des taureaux	Jour de collecte	Sperme frais		Dilueur 1		Dilueur 2		$X = \frac{vc + v_1 c_1 + v_2 c_2}{v + v_1 + v_2}$	D_3 bact/ml
		contamination bact./ml	Volume ml	contamination bact./ml	volume ml	contamination bact./ml	volume ml		
1	158	$1,6 \cdot 10^5$	9	10^3	47,25	<1	56,25	$1,3 \cdot 10^4$	<10
	165	$7,3 \cdot 10^2$	4,5	2	28	<1	32,5	$1,1 \cdot 10^3$	10
2	158	$8,4 \cdot 10^4$	13	10^3	72	<1	85	$6,8 \cdot 10^3$	<10
3	158	$5,6 \cdot 10^4$	6	10^3	52,75	<1	58,75	$3,3 \cdot 10^3$	$4,9 \cdot 10^3$
	168	$6,6 \cdot 10^5$	4	14	24,5	<1	32,5	$1,3 \cdot 10^4$	$3,2 \cdot 10^2$
	210	$1,8 \cdot 10^7$	5	92	28,75	10^3	33,75	$2,6 \cdot 10^5$	$1,2 \cdot 10^6$
4	158	$1,4 \cdot 10^4$	8	10^3	28,25	<1	36,25	$2,1 \cdot 10^3$	$7,4 \cdot 10^3$
	165	$5,2 \cdot 10^6$	5,5	2	35,75	<1	41,25	$6,3 \cdot 10^3$	$8,2 \cdot 10^3$
	168	$2,2 \cdot 10^5$	8	14	24,5	<1	32,5	$3,4 \cdot 10^3$	$4,0 \cdot 10^1$
5	158	$1,6 \cdot 10^4$	8,5	10^3	55,25	<1	63,75	$1,4 \cdot 10^3$	<10
	161	$2,9 \cdot 10^5$	8,5	<1	44	<1	52,5	$2,7 \cdot 10^3$	$1,3 \cdot 10^5$
	165	$5,6 \cdot 10^6$	4,5	2	23	<1	27,5	$1,1 \cdot 10^5$	$2,6 \cdot 10^2$
	168	$5,8 \cdot 10^3$	6	14	24,5	<1	32,5	$9,2 \cdot 10^1$	<10
	193	$9,4 \cdot 10^4$	4	<1	32,25	<1	36,25	$1,3 \cdot 10^3$	<10

Numéros des taureaux	Jour de collecte	Sperme frais		Dilueur 1		Dilueur 2		$X = \frac{vc + v_1 c_1 + v_2 c_2}{v + v_1 + v_2}$	D_3 bact/ml
		contamination bact./ml	volume ml	contamination bact./ml	volume ml	contamination bact./ml	volume ml		
6	158	$5,2 \cdot 10^4$	8,5	10^3	51,5	< 1	60	$4,1 \cdot 10^3$	$8,1 \cdot 10^2$
	189	$1,4 \cdot 10^5$	4,5	< 1	22,25	< 1	26,25	$2,6 \cdot 10^3$	$1,3 \cdot 10^2$
8	161	$1,6 \cdot 10^7$	4,5	< 1	23	< 1	27,5	$2,9 \cdot 10^5$	$2,4 \cdot 10^5$
	189	$2,2 \cdot 10^6$	5	< 1	17,5	< 1	22,5	$4,8 \cdot 10^4$	$3,8 \cdot 10^4$
9	161	$7,5 \cdot 10^5$	6	< 1	30,25	< 1	36,25	$1,1 \cdot 10^4$	$1,0 \cdot 10^2$
10	165	$1,2 \cdot 10^6$	5,5	2	39,5	< 1	45	$1,3 \cdot 10^4$	$3,1 \cdot 10^4$
	210	$9,0 \cdot 10^5$	6,5	92	8	10^3	10	$3,7 \cdot 10^4$	$5,1 \cdot 10^4$
11	168	$4,0 \cdot 10^6$	4	14	23,5	< 1	27,5	$7,2 \cdot 10^4$	$1,2 \cdot 10^4$
12	189	$2,4 \cdot 10^4$	5	< 1	25	< 1	30	$4,0 \cdot 10^2$	$2,0 \cdot 10^2$
13	165	$3,4 \cdot 10^6$	7	2	65,5	< 1	72,5	$2,3 \cdot 10^4$	$4,1 \cdot 10^2$
	207	$6,4 \cdot 10^5$	5,5	< 1	55,75	< 1	61,25	$5,2 \cdot 10^3$	$1,1 \cdot 10^3$
14	168	$2,3 \cdot 10^5$	2	14	20,5	< 1	22,5	$4,6 \cdot 10^3$	< 10
	189	$1,0 \cdot 10^6$	3	< 1	22	< 1	25	$2,0 \cdot 10^4$	$1,0 \cdot 10^2$

Numéros des taureaux	Jour de collecte	Sperme Frais		Dilueur 1		Dilueur 2		$X = \frac{vc + v_1 c_1 + v_2 c_2}{v + v_1 + v_2}$	D_3 bact/ml
		contamination bact./ml	volume ml	contamination bact./ml	volume ml	contamination bact./ml	volume ml		
15	189	$6,5 \cdot 10^4$	7	< 1	28	< 1	35	$9,3 \cdot 10^2$	$1,1 \cdot 10^4$
	231	$3,6 \cdot 10^2$	4	< 1	21	< 1	25	7,2	< 10
16	193	$1,2 \cdot 10^4$	6	< 1	62,75	< 1	68,75	$8,7 \cdot 10^1$	< 10
17	229	$1,4 \cdot 10^5$	4,5	< 1	23	< 1	27,5	$2,5 \cdot 10^3$	$8,8 \cdot 10^3$
18	229	$1,5 \cdot 10^5$	4,5	< 1	18	< 1	22,5	$3,3 \cdot 10^4$	< 10

RECHERCHE D'UNE VARIABILITE DE CONTAMINATION BACTERIENNE INTER-PAILLETES.

numéros des taureaux	Jour de collecte	D ₃ bactéries/ml			D ₄ Bact./ml
		1ère paillette	2è paillette	3è paillette	
3	210	$3,2 \cdot 10^6$	$9,6 \cdot 10^4$	$1,2 \cdot 10^6$	$1,4 \cdot 10^6$
10	210	$5,1 \cdot 10^4$	$9,0 \cdot 10^3$	$4,9 \cdot 10^4$	$9,3 \cdot 10^3$
13	207	$1,3 \cdot 10^3$	$9,1 \cdot 10^2$	$1,0 \cdot 10^3$	$8,6 \cdot 10^2$
15	231	< 10	< 10	< 10	< 10
17	229	$6,7 \cdot 10^3$	$1,3 \cdot 10^4$	$6,7 \cdot 10^3$	$6,1 \cdot 10^3$
18	229	< 10	< 10	< 10	< 10



CONTAMINATION BACTERIENNE COMPAREE DE DEUX EJACULATS SUCCESSIFS.

numéros des taureaux	Jour de collecte	1er Ejaculat		2ème Ejaculat	
		D ₁ bact./ml	qualité	D ₁ bact./ml	qualité
3	210	6,0.10 ⁶	+	1,8.10 ⁷	+
3	231	1,7.10 ⁴	+	1,9.10 ⁵	-
10	210	1,8.10 ⁷	+	2,2.10 ⁶	-
15	231	3,6.10 ²	+	4,1.10 ⁵	-
17	229	1,4.10 ⁵	+	2,3.10 ⁶	-
18	229	1,5.10 ⁵	+	7,7.10 ⁵	-