

CHAPITRE V

TECHNIQUES DE L'INSÉMINATION ARTIFICIELLE

O. MACKENSEN

*Bee Breeding Investigations Laboratory, Room 240,
Agricultural Center, L. S. U. Baton Rouge, Louisiana 70803, U. S. A.*

On se familiarise mieux avec l'insémination artificielle des reines d'abeilles par l'enseignement direct d'une personne qui possède l'expérience de cette technique. Une installation permettant à l'élève et au professeur d'observer l'opération en même temps sous une loupe binoculaire offre de précieux avantages. Un maître en la matière n'étant pas toujours disponible, le processus est décrit ici avec suffisamment de détails pour que le lecteur puisse s'initier sans autre aide à la technique. Celui-ci retiendra toutefois que la description vaut pour l'appareil que nous utilisons et qu'il devra donc adapter nos techniques à son propre équipement.

Les précautions à prendre sont les suivantes :

1. Les reines doivent être élevées dans les meilleures conditions de manière à atteindre la plus grande taille possible.

2. Si les reines d'une certaine provenance sont difficiles à inséminer, en essayer d'une autre provenance. Les souches et les races diffèrent fort entre elles sous le rapport de la facilité d'insémination. Chez certaines on peut apercevoir fréquemment la valvule vaginale, chez d'autres jamais.

3. La pointe de la seringue doit être suffisamment fine pour pénétrer aisément à mi-chemin de l'oviducte, mais son diamètre intérieur doit néanmoins être aussi large que possible. J'estime qu'un diamètre extérieur de 0,25 mm et un diamètre intérieur de 0,15 mm sont généralement satisfaisants (ces dimensions sont prises avant le polissage de la pointe). Les débutants éprouvent moins de difficultés à introduire la seringue lorsque le diamètre extérieur de la pointe n'est que de 0,23 mm. Dans ce cas le diamètre intérieur doit être de 0,13 mm, ce diamètre intérieur étant le minimum permettant encore la bonne réussite de l'opération. Des diamètres extérieurs allant jusqu'à 0,30 mm peuvent encore donner satisfaction lorsqu'on opère sur des reines de très grande taille.

Le diamètre intérieur de la pointe de la seringue doit s'élargir dès l'extrémité

de celle-ci : il est plus facile d'aspirer le sperme dans une seringue de ce genre que dans une seringue dont le diamètre demeure constant sur une certaine longueur.

5. On opérera, si possible, dans une atmosphère humide. Les tissus dénudés de la reine sèchent rapidement à l'air sec, ce qui rend plus difficile l'introduction de la seringue ; il peut arriver aussi que le sperme sèche à l'extrémité de la seringue, empêchant ainsi l'admission d'autre sperme.

6. Quoiqu'il existe de nombreuses méthodes de conservation des reines entre leur éclosion et leur insémination, l'accumulation de matières fécales qui se produit dans certaines de ces méthodes peut gêner l'insémination. Un rectum gonflé, par exemple, déplace les voies génitales, de sorte qu'il devient difficile de trouver, de la pointe de la seringue, l'ouverture de l'oviducte et de retenir l'aiguillon en arrière. L'accumulation des matières fécales dépend de la méthode de conservation des reines, elle est la plus forte lorsqu'on conserve de nombreuses reines en cagettes dans une seule colonie d'élevage ; vient ensuite la conservation d'une reine encagée seule dans un nucléus puis d'une reine unique libre dans le nucléus. Le débutant préférera généralement cette dernière méthode.

7. L'opérateur expérimenté peut se contenter d'un grossissement unique de 10 à 12 fois sur le remplissage de la seringue et l'introduction dans le corps de la reine. Je recommande au débutant de remplir la seringue sous un faible grossissement (6 à 10 x) et de procéder à l'introduction sous un grossissement plus fort (20 x).

PROCESSUS D'INSÉMINATION

La description suivante du processus d'insémination est rédigée à l'intention du débutant qui utilise l'appareil représenté aux figures 12-19.

Préparation de l'anesthésique

Le tuyau d'admission de gaz carbonique muni à son extrémité du piston de retenue de la reine est tiré sur une longueur d'environ 2 cm à travers le bloc de retenue en vue de la mise en place du logement de la reine. Afin de maintenir suffisamment faible le débit de gaz carbonique, on plonge le piston dans de l'eau, ce qui permet d'apprécier le débit. L'expérience apprendra quel est le débit convenable : il doit être juste assez abondant pour calmer la reine.

Préparation de la seringue

Pour préparer la seringue on commence par en remplir la pointe d'un liquide. On recommandait jadis d'utiliser de l'eau à cette fin, mais l'eau tue une partie du sperme avec lequel elle entre en contact. Une solution à 0,9 p. 100 de chlorure de sodium donne satisfaction. On se servira d'un flacon injecteur en plastique, du type utilisé dans les laboratoires, pour faire pénétrer le liquide dans la pointe de la seringue. On remplit ensuite de solution saline la pièce intermédiaire (fig. 19 A) et on y visse la pointe, de manière à l'appliquer fermement à la membrane. Bien veiller à ce qu'il ne se produise aucune inclusion d'air.

La pièce intermédiaire est ensuite vissée dans le corps métallique de la seringue. En faisant tourner la vis et avancer le piston on exprime juste autant de liquide qu'il faut pour pouvoir aspirer la quantité désirée de sperme lorsqu'on fait de nouveau reculer le piston. On aspire ensuite une petite bulle d'air, qui isole le sperme de la solution saline. La seringue est ensuite fixée à l'appareil et ajustée de telle manière que la pointe ne gêne pas pendant que l'on prépare la reine.

Préparation de la reine

On place la reine de manière à ce qu'elle entre de son propre mouvement dans un petit tube de plastique du même format que le logement, mais presque entièrement fermé à l'autre bout (fig. 15 B). La reine rebrousse chemin aussitôt qu'elle aura atteint cette extrémité à demi obturée et pénétrera généralement volontiers dans son logement si celui-ci a été mis en place. Aussitôt qu'elle atteint le bout rétréci du logement, et sans lui laisser le temps de revenir en avant, on place rapidement derrière elle le bouchon d'admission de gaz. Les trois derniers segments visibles de l'abdomen doivent faire saillie et les pattes postérieures doivent rester à l'intérieur du logement. Les débutants préféreront peut-être installer un robinet à trois voies sur le tuyau à gaz, de manière à pouvoir dévier le flot de gaz pendant que la reine est placée dans la position correcte. (Une dilatation anormale de l'abdomen signifie que du gaz est forcé dans ses poches d'air et que le débit est donc trop fort). On introduit le logement de la reine dans le bloc de retenue en tirant sur le tuyau à gaz et on le fixe de manière à ce que la surface dorsale de la reine soit tournée à droite.

La reine est généralement déjà parfaitement calme au moment où elle est ainsi mise en place et l'on peut désormais engager les crochets de fixation, le crochet ventral à gauche, le crochet dorsal à droite. Ceci s'effectue mieux sous un faible grossissement. On engage d'abord le crochet ventral, puis le crochet dorsal dans la gaine de l'aiguillon et l'on écarte ensuite les sternites abdominaux. Tandis qu'on se sert de la main gauche et du dépresseur d'aiguillon pour abaisser celui-ci, on place le crochet dorsal dans l'espace triangulaire entre les bases des soies de l'aiguillon. Le crochet dorsal est maintenu dans cette position afin d'éviter que les tissus si délicats ne se dessèchent pendant que l'on charge la seringue.

Remplissage de la seringue

La facilité avec laquelle on amène les mâles à éjaculer et la quantité de sperme recueillie diffèrent grandement d'un individu à l'autre, surtout lorsqu'on utilise des spécimens de lignées consanguines. Certains n'ont pas de sperme, d'autres n'entrent pas en érection et n'éjaculent pas de manière satisfaisante lorsque la stimulation est artificielle; d'autres encore ont une érection si violente que le sperme est projeté trop loin et perdu ou que leur pénis explose.

Afin de l'inciter à l'érection et à l'éjaculation, on saisit le mâle par la tête et par le thorax entre le pouce et l'index de la main gauche, sa surface ventrale étant tournée vers le haut. Tandis qu'on lui serre de la main gauche la tête et la partie antérieure du thorax, on palpe, on serre légèrement et à plusieurs reprises du pouce et de l'index droits la partie dorsale de son abdomen. Cette manipulation provoque généralement une contraction des muscles abdominaux, une érection et une éjacu-

lation partielles, parfois aussi plus ou moins complètes (fig. 4). Si l'érection n'est que partielle et qu'aucun sperme n'apparaît (fig. 4 a) l'abdomen est serré progressivement de la partie dorso-antérieure vers la partie ventro-postérieure, de manière à ce que l'érection se poursuive par force jusqu'à éjaculation du sperme (fig. 4 b). Sans contraction abdominale on n'obtient que rarement du sperme, mais quand l'abdomen se contracte avec érection partielle, cette érection peut souvent être achevée par la pression et produire une bonne quantité de sperme. Certains mâles éjaculent mieux si on leur fait prendre d'abord un peu d'exercice en les tenant par les pattes à l'aide de pinces tandis qu'ils essaient de s'envoler, ou en leur permettant de voler contre un carreau de verre. Les mâles capturés au seuil de la ruche à leur retour d'un vol éjaculeront peut-être mieux si on les encage pendant toute une journée. Il se peut que ces méthodes fassent augmenter le volume de l'abdomen en forçant de l'air dans les sacs trachéens ou en augmentant l'accumulation de matières fécales ; la contraction des muscles abdominaux agit ainsi plus efficacement sur l'érection du pénis.

Les débutants préféreront peut-être recourir au chloroforme pour provoquer une érection partielle. Le mâle placé dans un récipient contenant des vapeurs de chloroforme manifestera généralement une érection de l'importance montrée à la fig. 4 a. Le processus peut alors être complété comme décrit ci-dessus. L'opérateur expérimenté jugera parfois, lui aussi, ce procédé comme étant très indiqué.

La distribution du sperme et du mucus ainsi que la quantité de sperme varient. A mesure que l'érection se développe, le sperme, de couleur crème, jaillit d'abord et est suivi du mucus blanc plus épais. Il arrive que du sperme soit éjaculé seul, mais une certaine quantité de mucus le suit généralement. Les deux substances sont distribuées en proportions variables sur le pénis. Les mouvements des spermatozoïdes peuvent avoir pour résultat de répandre le sperme en une mince couche pardessus le mucus, de sorte qu'il est difficile de le recueillir. Il est donc important de le prélever sans perdre de temps.

L'éjaculation s'étant accomplie, le mâle est tenu avec la main gauche tout près de la seringue et l'on fait légèrement reculer le piston de celle-ci afin de créer un espace d'air entre le sperme et la solution saline, ainsi qu'il a déjà été décrit, et afin de faciliter la mesure de la quantité de sperme. La surface de celui-ci est ensuite amenée à toucher la pointe sous un angle d'environ 45 degrés. Si l'on écarte légèrement le mâle de la seringue sans pour autant rompre le contact, le sperme continuera à adhérer à la seringue et coulera vers elle quand on fait reculer le piston. Cette manière de procéder évite à l'opérateur l'inconvénient de recueillir aussi du mucus, lequel est plus visqueux et ne coule pas comme le fait le sperme. Le mucus est d'ailleurs aussi trop épais pour pénétrer dans l'ouverture de la seringue et il empêcherait le sperme de passer. Si cela se produit, on avance le piston jusqu'à ce que le passage soit dégagé et l'on reprend ensuite le prélèvement du sperme. En faisant se mouvoir la seringue on parvient à séparer pratiquement tout le mucus du sperme qui le recouvre. Le sperme est prélevé sur autant de mâles qu'il en faut pour remplir la seringue au point voulu. La quantité moyenne de sperme prélevée est d'environ 1 μ l. Le débutant procédera très lentement au prélèvement. La rapidité augmentera avec l'expérience.

Injection

Le microscope est mis en place au-dessus de la reine et le grossissement est augmenté. Le crochet dorsal est avancé vers le dos jusqu'à ce que la gaine de l'aiguillon se présente comme il est montré à la figure. De cette façon la paroi dorsale de la gaine de l'aiguillon et celle du vagin se trouvent tendues de manière à ce que la seringue puisse glisser sur leur longueur et pénétrer dans l'oviducte moyen.

La pointe de la seringue est ensuite placée au-dessus de l'orifice du vagin. En se servant de la main gauche on insère la sonde vaginale dans la partie dorsale du vagin et la valvule vaginale est poussée contre la paroi ventrale jusqu'au point permettant le passage de la seringue (fig. 29). La sonde vaginale est ensuite retirée tandis que la seringue pénètre jusqu'à environ 1,5 mm de profondeur. Si le tissu environnant se met à bouger avant que la seringue n'ait atteint cette profondeur, il est probable que celle-ci s'est insérée dans une des poches latérales qui flanquent le vagin de part et d'autre (fig. 1).

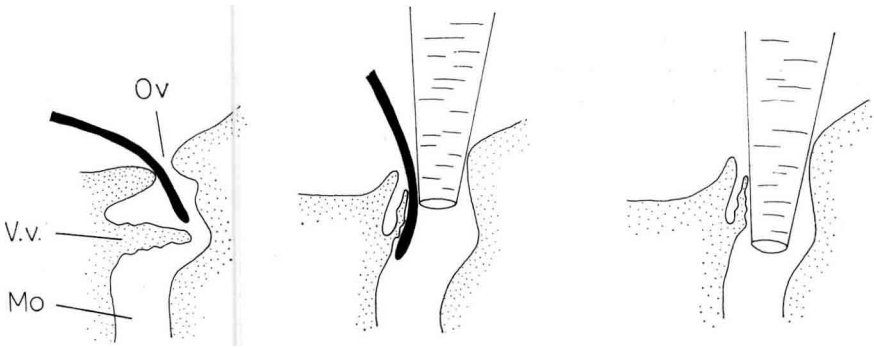


FIG. 29. — Introduction de la sonde vaginale (en noir) et de la canule d'insémination artificielle dans l'oviducte médian (d'après LAIDLAW)

Ov : Orifice du vagin ; Mo : Oviducte médian ; Vv : Valvule vaginale.

On s'appliquera à injecter soigneusement le sperme. Si la colonne de sperme ne bouge pas immédiatement et que l'air qui la sépare de la solution saline commence à se comprimer, cela signifie que la seringue n'a pas pénétré dans l'oviducte et doit être retirée pour un nouvel essai. Il se peut que certains ajustements soient nécessaires. La ligne médiane dorso-ventrale du corps de la reine doit être très exactement alignée sur les crochets, ventral et dorsal, et la seringue doit être exactement insérée dans cette ligne. Si ces précautions sont observées, l'insertion erronée de la seringue dans une des poches latérales ne se produira que rarement. L'injection peut être promptement achevée lorsque le sperme commence à se déplacer correctement, sans fuite autour de la pointe de la seringue.

Stérilisation

La pointe de la seringue n'est ordinairement nettoyée que lorsque l'opérateur passe d'un type de sperme à un autre ou à la fin de sa journée de travail. Elle peut souvent être suffisamment nettoyée en y faisant simplement passer de l'eau. Les

matières adhérant aux parois intérieures de la section à diamètre intérieur uniforme peuvent être détachées à l'aide d'un piston de fil métallique du diamètre approprié ; un morceau de fil métallique d'un diamètre de 0,13 mm, ou moins, est utilisé pour la section à étranglement. L'extrémité de ce fil métallique doit être coupée bien net, sans arêtes vives qui pourraient endommager la mince paroi de plastique.

Le rinçage à l'eau est censé tuer tout résidu de sperme ; on peut néanmoins, s'il faut passer rapidement d'un type de sperme à un autre, stériliser la pointe à l'aide d'un agent approprié n'affectant pas le plastique. L'alcool éthylique attaque le plastique, mais une eau de Javel ménagère ordinaire (agent actif : hypochlorite de soude) donne satisfaction. Si l'on veut prévenir la propagation de maladies des abeilles adultes, on se stérilisera les mains et tous les instruments qui entrent en contact avec la reine ; de l'alcool éthylique à 70 p. 100 peut être utilisé à cette fin pour tous les matériaux, le plastique excepté. Si une stérilisation est nécessaire, il faudra disposer de pièces de rechange pour les différents éléments délicats de l'équipement.

Maladies

Selon mon expérience, deux maladies des abeilles adultes peuvent être transmises par l'insémination artificielle : la paralysie, apparemment celle provoquée par le virus de la paralysie chronique des abeilles (BAILEY, 1965), et la septicémie, cause de mutilations par nécrose (BURNSIDE, 1928 ; LANDERKIN et KATZNELSON, 1959). Ces deux maladies peuvent ne pas se manifester pendant plusieurs années, mais leurs conséquences peuvent être désastreuses quand elles se déclarent. Les septicémies signalées par WILLE et PINTER (1961) seraient probablement tout aussi graves.

La reine qui contracte une septicémie pendant l'insémination mourra un ou deux jours plus tard et présentera les symptômes typiques de mutilations par nécrose. J'ai remarqué que la stérilisation de tous les éléments entrant au contact direct de la reine réduit à des proportions négligeables les pertes dues à cette maladie.

La paralysie tue moins vite que la septicémie. Les reines rendues à leur nucléus après l'insémination vivent encore pendant plusieurs jours, puis disparaissent ou deviennent graduellement léthargiques et gonflées d'humeurs. Elles peuvent vivre plusieurs jours dans cet état sur les rayons ou après être tombées sur la planche du fond de la ruche ; certaines pondront même quelques œufs avant de devenir malades. La maladie peut être évitée dans une large mesure par l'emploi de mâles marqués circulant librement ou de mâles engagés mais âgés de moins de 3 semaines. Si la maladie se manifeste, tous les instruments qui touchent la reine doivent être stérilisés.

Emploi du gaz carbonique

Le gaz carbonique ne sert pas uniquement à anesthésier les reines, il les incite aussi à pondre (MACKENSEN, 1947). Convenablement traitées avec ce gaz, les reines vierges ainsi que les reines inséminées commencent à pondre pratiquement aussi tôt que les reines fécondées par accouplement. Sans ce traitement, seulement 20 p. 100 des reines commencent à pondre avant le 30^e jour suivant leur éclosion.

Il faut au moins deux anesthésies pour déclencher la ponte. Les séances peuvent durer chacune dix minutes, à un jour d'intervalle ; elles peuvent aussi être combinées avec une insémination. Pour plus de sûreté on peut faire une troisième narcose. Pour

l'anesthésie sans insémination on place la reine encagée dans un récipient approprié, où passe un courant de gaz carbonique (fig. 12). Si l'on veut que la reine pondre à l'âge normal (8 à 11 jours après l'éclosion), la seconde anesthésie doit être administrée avant le septième jour, de préférence même avant le sixième, puisque la reine commence à pondre de 2 à 6 jours après le second traitement. Si des anesthésies administrées dès le deuxième ou le troisième jour suivant l'éclosion sont efficaces, elles ne déclenchent néanmoins pas de ponte avant l'âge normal. Les reines traitées après le 5^e jour commencent à pondre en moyenne dans les 6 jours suivant le deuxième traitement.

Ces traitements ne semblent pas avoir d'effets néfastes, mais il convient cependant de les réduire à un minimum aussi longtemps qu'on ne connaît pas mieux tous les effets qu'ils ont sur les reines : il est notoire que le gaz carbonique accélère le vieillissement des abeilles ouvrières (SIMPSON, 1954). La dose efficace minimum n'a pas, non plus, été déterminée, quoique je présume que l'on puisse réduire à la fois la durée du traitement et l'intervalle entre les traitements.

Il semble que même un seul traitement au gaz carbonique puisse exercer une influence sur l'époque de la ponte initiale. Les reines noires inséminées par WOYKE (1963) avec une seule exposition au gaz carbonique pendant l'insémination ont commencé à pondre en moyenne de 8 à 12 jours après l'insémination, soit bien avant les 36 jours dont MACKENSEN (1947) fait état à propos de reines Américano-Italiennes inséminées d'une manière similaire. WOYKE a aussi constaté que l'augmentation de 1 à 16 μ l du volume de semence ne faisait pas diminuer l'âge de ponte initiale.

Age des reines et des mâles

Mesurées au nombre de spermatozoïdes atteignant la spermathèque, les inséminations peuvent être faites avec autant de succès le deuxième jour suivant l'éclosion que plus tard (MACKENSEN, 1953).

Il est probablement préférable d'inséminer à l'âge nubile normal. OERTEL (1940) a constaté que cet âge s'étale du sixième au treizième jour, la majorité des accouplements ayant lieu le huitième jour et le neuvième. FRESNAYE (1966) perdit plus de reines quand les inséminations étaient effectuées à 5 jours que quand elles l'étaient à 10 et 12 jours ; les pertes étaient surtout fréquentes au début du printemps, quand le temps froid avait retardé le développement. J'ai obtenu à Baton Rouge, Louisiane, une égale réussite avec des reines âgées de 4 à 11 jours à la fin de mars et en avril en utilisant de 5 à 8 microlitres en une insémination ou en inséminant deux fois cette quantité. Les reines peuvent être inséminées à un âge plus avancé, aussi longtemps qu'elles n'ont pas commencé à pondre. Des précautions spéciales doivent être prises lorsqu'on insémine des reines qui pondent déjà (voir ci-dessous). Les mâles ne possèdent pas le maximum de sperme avant l'âge de 8 jours, mais le sperme demeure efficace à tout âge. Les éversions et éjaculations sont souvent meilleures quand les mâles sont âgés de quelques jours de plus.

TECHNIQUES DIVERSES

Le nombre d'inséminations et la quantité de sperme dépendront du but visé par l'opérateur, du temps et des efforts qu'il aura consacrés aux opérations. L'efficacité, c'est-à-dire, le pourcentage de spermatozoïdes atteignant la spermathèque, diminue à mesure qu'augmente la quantité de sperme injectée.

Si une reine est appelée à pondre pendant une saison ou plus longtemps, dans une colonie expérimentale, il est logique de chercher à doubler la quantité de sperme qu'elle reçoit normalement à l'accouplement naturel ou à atteindre la quantité qui la satisfait assez complètement pour qu'elle ne cherche pas à être fécondée une seconde fois. WOYKE (1960) a signalé une moyenne de 5,22 millions de spermatozoïdes (limites : 3,40-6,96) dans la spermathèque de 16 reines accouplées dans une station sans mâles et de 4,76 millions (limites : 0,76-6,14) dans celle de reines fécondées dans un rucher nanti de mâles. MACKENSEN et ROBERTS (1948) ont signalé une moyenne de 5,73 millions de spermatozoïdes (limites : 3,34-7,35) chez 33 reines fécondées par voie naturelle. WOYKE (1960) a relevé au cours de recherches approfondies sur la fécondation par voie naturelle que les reines ne recherchaient plus d'accouplement après avoir été fécondées à raison d'en moyenne 5,284 millions de spermatozoïdes dans la spermathèque. Les reines qui s'accouplaient une seconde fois ou entreprenaient un second vol nuptial sans accouplement n'avaient reçu qu'un nombre moindre de spermatozoïdes lors du premier accouplement. WOYKE conclut que pour être complètement fécondée, la spermathèque d'une reine artificiellement inséminée doit contenir à peu près ce nombre de spermatozoïdes. Il a relevé qu'une insémination artificielle comportant jusqu'à 6 μ l de sperme ne donnait en moyenne, que jusqu'à 4,12 millions de spermatozoïdes, c'est-à-dire une quantité insuffisante. L'introduction de 8 à 10 μ l de sperme en une insémination et deux inséminations de 4 μ l chacune se révélèrent suffisantes puisqu'elles garnirent la spermathèque respectivement de 5,37 à 5,53 et 5,42 millions de spermatozoïdes.

MACKENSEN (1964) a fait état de nombres moins élevés de spermatozoïdes atteignant la spermathèque. Il a relevé pour des inséminations uniques de 8 à 10 μ l de sperme respectivement des moyennes de 3,3,16 et 3,32 ; pour deux inséminations de 6 μ l de sperme il a compté 4,26 millions de spermatozoïdes. Deux inséminations l'une de 2 μ l et l'autre de 3 μ l se révélèrent un peu plus efficaces que des inséminations uniques de 8 et de 10 μ l.

Une insémination rapide utilisant 3 ou 4 mâles suffira dans le cas des reines dont on désire qu'elles ne soient fécondes que pendant un temps limité.

Il arrive souvent, dans l'élevage et dans les expériences de génétique, que chaque reine ne doive s'accoupler qu'à un seul mâle. Il s'agit alors d'obtenir de ce seul mâle le plus grand nombre possible de spermatozoïdes. Il faut disposer à cette fin de mâles bien adultes et bien nourris et utiliser uniquement ceux qui éjaculent à la perfection et produisent une grande quantité de liquide séminale riche en sperme. Les meilleurs mâles produisent au moins 1,25 μ l de sperme. Dans une série d'accouplements individuels, à peu près toutes les reines peuvent pondre 100 p. 100 d'œufs fécondés mais quelques-unes peuvent être en partie « bourdonneuses ». Certaines

reines qui commencent à pondre des œufs fécondés peuvent devenir tôt des « bourdonneuses » partielles ou totales tandis que d'autres peuvent se maintenir pendant 2 saisons dans un nucléus.

Un opérateur expérimenté doit être en mesure d'obtenir plus de 90 p. 100 de reines pondreuses pendant la période la plus favorable de la saison pour autant que la souche soit vigoureuse et qu'aucune maladie ne se déclare. J'ai obtenu pendant les saisons d'élevage printanier de 1964 à 1966 inclus 92,5 p. 100 de reines pondreuses sur 759 reines inséminées deux fois avec 4 à 5 μ l de sperme.

TECHNIQUES COMPLÉMENTAIRES

Insémination des reines en cours de ponte

La reine pondreuse peut aussi être inséminée (MACKENSEN, 1951). On recourt à cette méthode lorsqu'une reine est accouplée à des mâles de sa propre souche pour obtenir un haut degré d'endogamie. La reine vierge est d'abord induite à pondre par un traitement au gaz carbonique. Quand ses mâles sont devenus adultes, elle est extraite de la ruche et placée pendant environ 4 jours dans une cage d'expédition de reines en compagnie de quelques ouvrières afin d'arrêter le développement des œufs et d'atrophier les ovaires. Elle est ensuite inséminée de la manière habituelle et avec de petites quantités de sperme. Deux inséminations de 3 μ l chacune donnent une moyenne de 2,01 millions de spermatozoïdes dans la spermathèque de 10 reines, qui pondent toutes 100 p. 100 d'œufs fécondés.

Insémination avec du sperme provenant d'une spermathèque

Si CALE et GOWEN ne furent pas les premiers à l'essayer, ils furent les premiers à appliquer cette technique dans la pratique (1964). Ils inséminèrent d'abord une reine avec le sperme d'un seul mâle, puis une fille avec du sperme provenant de la spermathèque de la mère et, finalement, une petite-fille avec du sperme de la même provenance (spermathèque de la grand-mère). Ils constituèrent de cette manière en seulement 12 semaines 6 lignées endogames avec un coefficient d'endogamie atteignant 95,5 p. 100. La spermathèque extirpée fut placée sur une lamelle de verre et recouverte d'une mince couche d'eau stérile pour prévenir sa dessiccation (une solution physiologique saline conviendrait mieux).

Le réseau trachéal fut enlevé, la spermathèque percée à l'aide d'une épingle, la seringue insérée dans la zone percée et le sperme aspiré.

Sperme en provenance de vésicules séminales

Il peut parfois être souhaitable d'obtenir du sperme provenant directement des vésicules séminales, par exemple quand on veut se procurer du sperme d'un seul mâle mutant qui ne parvient pas à éjaculer. On procède comme suit : effectuer à l'aide de ciseaux à pointes fines et très tranchants une entaille en travers de la partie dorsale antérieure à l'abdomen.

Découper ensuite chaque bord de l'entaille jusqu'à proximité de l'extrémité postérieure de l'abdomen et replier les tergites, de manière à mettre à nu les vésicules séminales et les glandes à mucus.

Trancher très soigneusement et très lentement les vésicules séminales à l'endroit où elles adhèrent à la glande à mucus. Les étaler sur un doigt et les serrer avec des pinces à proximité de l'extrémité des testicules. On déclenche ainsi une contraction péristaltique, qui expulse à l'autre extrémité le sperme que l'on aspire dans la seringue. Le sperme récolté par cette méthode n'est pas aussi efficace que celui recueilli après éversion et éjaculation (MACKENSEN, 1955).

Conservation et transport de sperme

Une méthode de conservation à court terme et de transport de sperme a été mise au point par TABER (1961) à la lumière des expériences de TABER et BLUM (1960), au cours desquelles une reine a pondu quelques œufs fécondés après avoir été inséminée de sperme conservé pendant 68 jours à température de laboratoire.

Le sperme de 30 à 40 mâles est introduit dans un tube capillaire d'un diamètre de 1,8 à 2,0 mm. Afin de concentrer le sperme au fond du tube et d'en exclure l'air, le tube est placé pendant environ 1 minute dans une centrifugeuse tournant à la vitesse de 10 000 tours/minute. L'extrémité ouverte du tube est ensuite obturée dans la flamme du bec-papillon d'un brûleur BUNSEN, mais on veille à tenir le sperme à l'abri de la chaleur.

L'espace demeurant au-dessus du sperme sera aussi réduit que possible.

Pour utiliser le sperme on brise le tube de manière à écarter la couche de 1 à 2 mm de sperme la plus proche de l'extrémité obturée à la flamme. Convenablement protégés, les tubes peuvent être expédiés dans les enveloppes utilisées pour la poste aérienne. Le sperme doit être utilisé le plus tôt possible après la préparation. Des expéditions par voie terrestre à l'intérieur des États-Unis et par avion à destination de pays étrangers ont été couronnées de succès.
