

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique

Université Abdelhamid Ibn Badis-Mostaganem

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département d'Agronomie

Laboratoire de Physiologie Animale Appliquée – LPAA –



Mémoire

Présenté en vue de l'obtention du diplôme de

MASTER

En Sciences Agronomiques

Option :

Génétique et Reproduction Animale

Par :

DEMNI FATIMA ZOHRA

Thème

**L'utilisation de miel d'euphorbe du sahara Algérien pour la
cryoconservation du sperme d'étalons arabe-barbe dans la
région de Tiaret**

Soutenu le : **11/07/2019**, devant le jury composé de :

President : Mr. KEBIR Ahmed

**Vétérinaire docteur en science au
laboratoire régionale de Mostaganem**

Encadrant : Mr. AYAD Mohmed Amine

MCB, ISV, Tiaret.

Co-encadrant : Mr. HALBOUCHE Miloud,

Professeur, U. de Mostaganem.

Examineur : Mr. MAZOUZ Mustapha

MCA, U. de Mostaganem.

Année universitaire: 2018/2019

Remerciements

Par la grâce de Dieu tout puissant j'ai pu réaliser ce mémoire de fin d'étude.

Je tiens à exprimer mes sincères remerciements :

A mes chers parents qui m'a donnée les coudes de mains financière, morale, conseil et sentimentale pour finir ces études et ce travail.

Ce mémoire a pu voir le jour grâce à Dr. AYAD MOHAMED AMINE, maître de conférences à Institut des sciences vétérinaires de Tiaret.

Je le remercie pour son honneur d'encadrer mon travail, ses conseils, ces illustrations et sa gentillesse.

*Je souhaite remercier tout particulièrement monsieur **KEBIR AHMED**, Vétérinaire, docteur en science et Directeur de laboratoire vétérinaire régionale de Mostaganem pour avoir accepté d'être président du jury et d'être disponible pour la soutenance. Soyez assuré monsieur de ma profonde gratitude.*

*Je souhaiterais exprimer ma gratitude à monsieur **HALBOUCHE MILOUD** Professeur au département d'Agronomie, université Mostaganem. autant que mon Co-encadreur pour m'avoir donné envie de réaliser cette formation de master en génétique et reproduction animal, ainsi que pour ses multiples encouragements.*

*Mes remerciements vont également à monsieur **MAZOUZ MUSTAPHA** pour avoir accepté de participer à ce jury et examinateur de thèse, Soyez assuré monsieur de ma profonde gratitude.*

Je remercie tous les enseignants de l'institut des sciences vétérinaires de Tiaret qui ont donnés le maximum en de travail vigueur et enthousiasme dans la richesse animale du pays, ainsi que, tous les enseignants de l'université Abdelhamid Ibn Badis-Mostaganem qui nous ont formés au cours de toute l'année et tous les travailleurs de l'université de Mostaganem.

A tout ceux qui m'aidée et qui je n'ai pas pu citer. Remerciement chaleureux.

FATIMA ZOHRRA

DEMNI

*D*édicace

Je dédie ce modeste travail à mes parents pour toute l'aide qu'ils m'ont apporté durant mes années d'études.

Je le dédie aussi à mon cher frère Abd elhadi à mes sœurs :

Nadjet, Aichat, Soumia, Imen, et ces enfants : Salsabille, Roudina, Abd elilah, Khalil, Zakaria, la petite nièce Jana et son petit frère Islame.

Je le dédie enfin à mes amies et à tous mes collègues de 2^{ème} année master en sciences agronomique, option : Génétique et reproduction animale, promotion 2018-2019 et surtout à ma collègue Khadija pour toute l'aide et le support morale qu'il m'a apportée pour la réalisation de ce mémoire de fin d'étude.

FATIMA ZOHR

DEMNI

Résumé

L'objectif de ce présent travail est d'étudier l'effet de la supplémentation d'un dilueur de congélation (le Kenney modifié) avec différentes concentrations de miel d'abeilles (le miel d'euphorbe du Sahara d'Algérie) sur la motilité et la longévité des spermatozoïdes après décongélation, chez l'étalon arabe-barbe.

Un seul éjaculat de chacun des deux étalons arabe-barbe à été soumis à une cryoconservation avec un milieu de congélation (le Kenney modifié), sans aucune supplémentation (témoin) ou avec des concentrations en miel d'euphorbe à 1%, 2%, 3%, 4% et 5%. Après décongélation, tous les échantillons ont été maintenus à 37 ° C, tandis que les analyses ont été effectuées à 0, 1/2, 1 et 2 h. Le pourcentage de mobilité des spermatozoïdes, a été déterminé par des méthodes de laboratoire conventionnelles.

Par rapport au groupe témoin, la supplémentation en miel a montré une amélioration significative (**2%** et **3%**) ($P < 0,01$ au moins) après la décongélation du sperme, à 0, 1/2, 1 et 2 h. Pour le paramètre de la motilité du sperme, la concentration la plus faible (**1%**) et les concentrations les plus élevée (**4%** et **5%**) ne montrent pas de différences significatives ($P > 0,05$) par rapport au témoin.

La supplémentation en miel d'abeille (d'euphorbe) dans les dilueurs de sperme d'étalons arabes-barbes a permis de mieux améliorer les paramètres de la motilité et de la longévité du sperme après décongélation par rapport aux groupes témoins.

Mots clés: semence, étalon, cryoconservation, miel d'abeilles d'Algérie.

Abstract

The objective of this work was to evaluate the effect of the freezing extender (modified Kenney) supplemented with different concentrations of honey bees (honey spurge of the Algerian Sahara) on the motility and longevity of the Arab-barbe breed stallion spermatozoa after thawing.

Only one ejaculate from each of the two Arabian-barbe stallions was cryopreserved with freezing media (modified Kenney), without any supplementation (control) or with concentrations of 1% spurge honey, 2%, 3%, 4% and 5%. After thawing, all samples were held at 37 ° C, while the analyzes were performed at 0, 1/2, 1 and 2 h. The percentage of motility of the spermatozoa was determined by conventional laboratory methods. Compared to the control group, honey supplementation showed a significant improvement (2% and 3%) ($P < 0.01$ at least) after sperm thawing, at 0, 1/2, 1 and 2 h. For the sperm motility parameters, the lowest concentration (1%) and the highest concentrations (4% and 5%) did not show significant differences ($P > 0.05$) compared to the control.

Supplementation of bee honey (spurge) in sperm extenders of Arab-barbe stallions has improved the parameters of sperm motility and longevity after thawing compared to control groups.

Keywords : semen, stallion, cryopresevation, Algerian honey bees.

Table des matières

Résumé

Introduction

Première partie : Etude bibliographique

Chapitre I : Rappel sur l'appareil génital de l'étalon

I. La partie glandulaire (Testicules).....	2
I.1. Topographie des testicules.....	2
I.2. Anatomie des testicule.....	3
I.2.1. Organisation externe des testicules.....	4
A. Les enveloppes testiculaires superficielles.....	4
B. Les enveloppes testiculaires profondes.....	5
I.2.2. Organisation interne des testicules.....	6
A. Les tubes séminifères.....	7
B. Le tissu interstitiel.....	9
C. Vascularisation et innervation des testicules.....	9
II. La partie tubaire (excrétrice).....	10
II.1. Les voies spermatiques intra-testiculaires.....	10
II.2. Les voies spermatiques extra-testiculaires.....	10
II.2.1. L'épididyme.....	10
A. Le canal déférent.....	11
B. Les glandes vésiculaires.....	11
III. La partie uro-génitale.....	11
III.1. L'urètre d'étalon.....	11
A. L'urètre pelvien.....	12
B. L'urètre pénien.....	12
III.2. Glandes annexées à l'urètre.....	12
A. La prostate.....	13
B. Les glandes de Cowper.....	13
C. La verge ou pénis.....	14

Chapitre II :

Production de la semence chez l'étalon

I. De la spermatogénèse à l'éjaculation.....	15
I.1. Spermatogénèse et spermiogénèse	15
I.1.1. Spermatogénèse.....	15
I.1.2. Spermiogénèse.....	15
I.2. Structure de spermatozoïde.....	16
I.3. Maturation de spermatozoïde et capacitation.....	18
I.3.1. Maturation.....	18
I.3.2. Capacitation.....	19
II. Caractéristiques de la semence d'étalon.....	19
II.1. Aspect externe.....	19
II.1.1. Volume.....	19
II.1.2. Couleur et consistance.....	20
II.2. Composition chimique.....	21
II.3. Plasma séminal.....	21

Chapitre III :

Collecte et conservation de la semence chez l'étalon

I. Collecte de la semence.....	23
I.I. Méthodes de récolte de la semence.....	23
I.1.1. Récolte à l'aide du vagin artificiel.....	23
A. Description.....	23
B. Choix de type du vagin artificiel.....	24
C. Préparation du vagin artificiel.....	26
D. La collecte de sperme.....	26
I.1.2. La récolte par éjaculation chimique.....	27
II. Contrôle de la semence.....	29
II.1. Examens macroscopiques.....	29
II.1.1. Volume.....	29
II.1.2. Couleur et aspect.....	29
II.1.3. PH.....	30
II.2. Examen microscopique.....	30

II.2.1. Concentration.....	30
A. Evaluation par utilisation d'une cellule hématimétrique.....	30
B. Evaluation par utilisation du spectrophotomètre.....	31
II.2.2. La Motilité.....	32
II.2.3. La morphologie.....	35
III. Conservation de la semence.....	37
III.1. Conservation à court terme.....	37
III.1.1. Semence fraîche.....	37
III.1.2. Semence refroidie.....	38
III.1.3. Conservation à long terme (La Cryoconservation).....	39
A. Définition.....	39
B. Principe.....	39
III.2. La cryoconservation dans l'espèce équine.....	40
III.3. Les agents cryoprotecteurs.....	41
III.4. Dilution du sperme.....	42
III.5. Les dilueurs.....	43
III.6. Les différentes étapes de la cryoconservation.....	44
III.6.1. Récolte et évaluation de la semence.....	44
III.6.2. Séparation des différentes phases du sperme par centrifugation.....	45
III.6.3. La dilution.....	46
III.6.4. L'équilibration (la réfrigération).....	47
III.6.5. Le conditionnement.....	47
III.6.6. La congélation.....	48
III.6.7. La décongélation.....	49
III.6.8. Evaluation de la qualité de la semence congelée.....	50

Deuxième partie : Etude expérimentale

Matériel et méthodes.....	52
I. Lieu de l'expérimentation.....	52
II. Effectif de l'expérimentation.....	52
III. Déroulement des récoltes.....	53
III.1. La Préparation du vagin artificiel.....	53

III.2. La préparation d'étalon.....	54
III.3. La récolte.....	55
IV. Sélection des éjaculats pour la congélation.....	56
V. Préparation du milieu de dilution.....	57
V.1. Ingrédients.....	57
V.1. Ingrédients.....	58
VI. Préparation du milieu de Cryo-congélation.....	60
VI.1. Le Kenney modifié.....	60
VI.2. Miel d'abeille (d'euphorbe) Kenney modifié (MEKM).....	61
VII. Evaluation des semences après la récolte.....	62
VII.1. Examen macroscopique.....	62
VII.2. Détermination de la concentration.....	63
VII.3. Examen microscopique.....	64
VIII. Traitement de la semence.....	65
VIII.1. Dilution primaire.....	65
VIII.2. Centrifugation de la semence.....	66
VIII.3. Dilution secondaire.....	67
VIII.4. Equilibration.....	68
VIII.5 Conditionnement de la semence.....	68
VIII.6. Congélation des paillettes.....	69
VIII.7. Evaluation des paillettes après décongélation.....	70
VIII.7.1. Décongélation.....	70
VIII.7.2. Evaluation.....	71
IX. Test statistique.....	72
Résultats et discussion.....	72
Résultats.....	72
I. Evaluation de la semence après la récolte.....	72
II. Evaluation de la mobilité après décongélation.....	73

Discussion.....	75
Conclusion.....	79
Perspectives et recommandations.....	80
Références bibliographiques.....	81

Liste des figures :

Première partie : Etude bibliographique

Figure 01 : Dessin du tractus reproductif de l'étalon vue en coupe sagittale (MC. Kinnon A. 1993).....	1
Figure 02 : Testicule et épидидyme gauche d'un étalon (Barone, 2001).....	3
Figure 03 : Le testicule et ses enveloppes, conformation externe (Barone, 2001).....	4
Figure 04 : conformation intérieure et structure du testicule de l'étalon (Picket B.W. 1993).....	6
Figure 05 : glandes génitales accessoires de l'étalon, vue dorsale (P.L. Senger, Ph. D., 2003).....	14
Figure 06 : structure de pénis et du prépuce de l'étalon (P.L. Senger, Ph. D., 2003).....	14
Figure 07 : la spermatogenèse (Marie Allimant, 2010).....	16
Figure 08: structure d'un spermatozoïde (Marie Allimant, 2010).....	18
Figure 09 : aspect du sperme d'étalon après centrifugation (Marie Allimant, 2010).....	20
Figure 10 : vagin artificiel de type Missouri (Steven P. et al. 2011).....	25
Figure 11 : vagin artificiel de type Colorado (John Dascanio.2014).....	25
Figure 12 : vagin artificiel de type Nishikawa (Steven P. et al. 2011).....	25
Figure 13 : A : collecte de sperme éjaculé chimiquement à l'aide d'un pôle et d'une tasse attachée, B : préparation des comprimés d'imipramine pour une administration orale (John Dascanio. 2014).....	28
Figure 14 : Hématimètre : cellule de Thoma (https://slideplayer.fr/slide/3395368/).....	31
Figure 15 : photomètre Minitube avec cuvette remplie en sperme (John Dascanio. 2014).....	32
Figure 16 : microscope à contraste de phase muni d'une plaque chauffante.....	35
Figure 17 : Représentation schématique de la morphologie normale d'un spermatozoïde et quelque anomalie pouvant être rencontrées (Steven P. et al, 2011).....	37
Figure 18 : centrifugation de sperme dilué (A), puis aspiration de surnageant après centrifugation (B) (Steven P. et al. 2011).....	46
Figure 19 : identification (A), remplissage (B) et bouchage (C) des paillettes (John Dascanio. 2014)	48

Figure 20 : paillettes déposées sur une grille (A) ensuite placées dans une boîte de congélation en polystyrène au-dessus de l'azote liquide (B) puis stockées dans une cuve d'azote liquide(D) (John Dascanio. 2014 ; Steven P. et al. 2011).....49

Deuxième partie : Etude expérimentale

Figure 21: Le laboratoire de la reproduction équine de l'institut des sciences vétérinaires.....52

Figure 22 : Les étapes de préparation du vagin artificiel de type Missouri.....54

Figure 23 : L'excitation de l'étalon en présence de la jument « boute-en-train ».....55

Figure 24 : Les étapes de la récolte de sperme.....56

Figure 25 : Les ingrédients du milieu Kenney mesurés.....58

Figure 26: Les étapes de préparation du milieu Kenney.....59

Figure 27 : La préparation de plasma du jaune d'œuf.....61

Figure 28 : Les solutions de miel préparées.....61

Figure 29 : Le vagin artificiel acheminé au laboratoire.....62

Figure 30 : L'aspect et couleur du sperme récolté.....63

Figure 31 : La détermination de la concentration à l'aide d'un photomètre Minitube.....64

Figure 32 : Le diluant Kenney et l'éjaculat misent à l'étuve réglés à 37°C.....65

Figure 33 : La dilution de sperme et le remplissage des tubes coniques à centrifuger.....66

Figure 34 : L'aspect du sperme après centrifugation (à gauche), et du culot après l'aspiration de surnagent.....67

Figure 35 : Les aliquotes de Kenney modifié enrichie en miel à des différentes concentration.....68

Figure 36 : Le conditionnement des paillettes.....69

Figure 37 : Les paillettes placées au-dessus d'azote liquide en phase vapeur (à gauche), puis plongées en phase vapeur (à droite).....70

Figure 38 : Les étapes de décongélation des paillettes.....71

Figure 39 : L'évaluation de la motilité des spermatozoides sous le microscope optique.....72

Liste des tableaux :

Première partie : Etude bibliographique

Tableau 01 : Caractéristiques séminales de 222 étalons de sang des Haras Nationaux.....	20
Tableau 02 : les modèles du vagin artificiel couramment utilisés et leurs caractéristiques principales (Steven P. et al..2011).....	25
Tableau 03 : Note d'appréciation subjective de la mobilité massale des spermatozoïdes dans un échantillon (d'après : Fontbonne, 1992).....	33
Tableau 04 : Note d'appréciation subjective de la mobilité progressive des spermatozoïdes dans un échantillon (d'après : Fontbonne, 1992).....	34
Tableau 05 : composition de Kenney et de l'INRA96 (pour 1l) (Marc Stéphanie., 2015).....	44

Deuxième partie : Etude expérimentale

Tableau 06 : La composition du Kenney (pour 1l).....	57
Tableau 07 : Les caractéristiques séminales individuelles obtenues pendant le protocole.....	73
Tableau 08 : Les résultats générales d'évaluation de la motilité des spermatozoïdes obtenues après décongélation.....	73
Tableau 09 : L'effet du miel additionné au diluant Kenney modifié sur la motilité des spermatozoïdes des étalons arabe-barbe.....	74

Introduction

Introduction

Depuis une vingtaine d'années, la semence congelée a été bien utilisée pour l'insémination artificielle dans la filière équine, après qu'elle a été limitée pendant de nombreuses années dans certains pays de monde, notamment en Grande-Bretagne. et ce n'est qu'en **2001** que les deux plus grandes associations de race du monde, **l'American Quarter Horse** et **l'American Paint Horse**, ont autorisé l'insémination des juments avec de la semence congelée, stimulant un intérêt nouveau pour la technologie de cryoconservation de la semence d'étalon, ce qui a permis de diffuser la génétique des meilleurs étalons et d'importer celle des champions, (**Marc Stéphanie, 2015**).

Les congélations effectuées en dehors des saisons sportives permettent d'inséminer de nombreuses juments pendant la saison de reproduction pendant que les étalons concourent dans des lieux éloignés. Ainsi, les éleveurs ont en permanence accès à des doses d'insémination sans risques sanitaires (**Ponthier J. 2012**). En outre, la congélation a donné l'avantage de conserver le matériel génétique à long terme et d'accéder au sperme congelé si le sperme frais ou refroidi n'est pas disponible, et c'est grâce à elle que l'assurance contre la perte imprévue d'un étalon et la possibilité d'expédier le sperme dans le monde entier sont rendues possibles (**John Dascanio. 2014**).

Malheureusement, des inconvénients subsistent suite aux effets structurels néfastes sur les spermatozoïdes induits par la cryoconservation, du fait de leur exposition au stress thermique, mécanique, osmotique et oxydants lors de la congélation-décongélation. D'une part, après décongélation la durée de vie des spermatozoïdes est courte et la motilité est réduite, ce qui diminue la capacité de fertilisation des spermatozoïdes (**Daels, 2003**). D'autre part, malgré une bonne qualité de sperme frais, **20 %** des éjaculats équins ne supportent pas la congélation, la qualité du sperme après décongélation étant insuffisante pour des raisons encore inconnues (**Vidament et al. 1997**). Face à ces faits, un intérêt international pour l'application de sources médicales naturelles notamment dans le domaine de la cryoconservation de la semence équine devient existant, afin d'améliorer la qualité du sperme congelé.

Les effets bénéfiques du miel d'abeille sur la protection de la santé de la reproduction ont été fortement mis en évidence par de nombreux auteurs, ils sont principalement attribués à sa teneur en éléments nutritifs, tels que des sucres, des minéraux, l'acide caféique, les glycones

Introduction

Flavonoïdes ainsi que les vitamines. **Olayemi et al. (2011)**, ont conclu que l'ajout de miel au diluant de jaune d'œuf améliorait la motilité et le taux de mortalité, ainsi que la viabilité du sperme de bouc au stockage liquide. **Fakhrildin et Alsaadi. (2014)**, ont conclu que la supplémentation du miel d'abeilles domestiques (**10%**) à la solution de cryoprotecteur montre une amélioration des paramètres du sperme après décongélation chez l'homme. **Jerez-Ebensperger et al. (2015)**, ont signalés des valeurs de qualité du sperme élevées dans les béliers lorsque le dilueur contenait du jaune d'œuf et du miel pasteurisés à **0 h et 2 h** après la décongélation.

Dans ce contexte, l'objectif de ce présent travail est donc d'étudier les effets de miel additionné au dilueur de congélation à des différentes concentrations sur la mobilité et la longévité du sperme d'étalons arabes-barbes après décongélation.

Le mémoire comporte une partie bibliographique composée de trois chapitres et une partie expérimentale divisée en 3 parties : la première présente la méthodologie de travail, la deuxième la présentation et la discussion des résultats obtenus et la troisième la conclusion, ainsi que les perspectives.

Etude bibliographique

Chapitre I
Rappel sur l'appareil
génital de l'étalon

L'appareil reproducteur mâle a pour rôle la production de sperme et son dépôt dans les voies génitales femelles où se réalise la fécondation, il peut se décomposer en trois grandes parties qui possèdent des fonctions différentes : (**Baronne R. 2001 ; Florence Batellier ; 2005**)

- **une partie glandulaire**, à savoir les deux testicules dont le rôle est la formation des spermatozoïdes et l'élaboration des hormones sexuelles mâles.
- **une partie tubulaire**, à savoir les voies spermatiques qui acheminent les spermatozoïdes à l'intérieur des testicules puis à l'extérieur par l'épididyme et le conduit déférent jusqu'à l'urètre.
- **une partie uro-génitale**, commune aux voies urinaire et génitale, composée elle-même de deux parties : **l'urètre pelvien**, situé dans le bassin, où de nombreuses glandes **annexes** sécrétrices se terminent, assurant l'élaboration d'un liquide spermatique qui dilue et nourrit les spermatozoïdes afin de faciliter leur maturation leur survie et leur transport, et **l'urètre pénien** qui aboutit au méat urinaire et auquel s'ajoutent des formations érectiles annexes volumineuses.

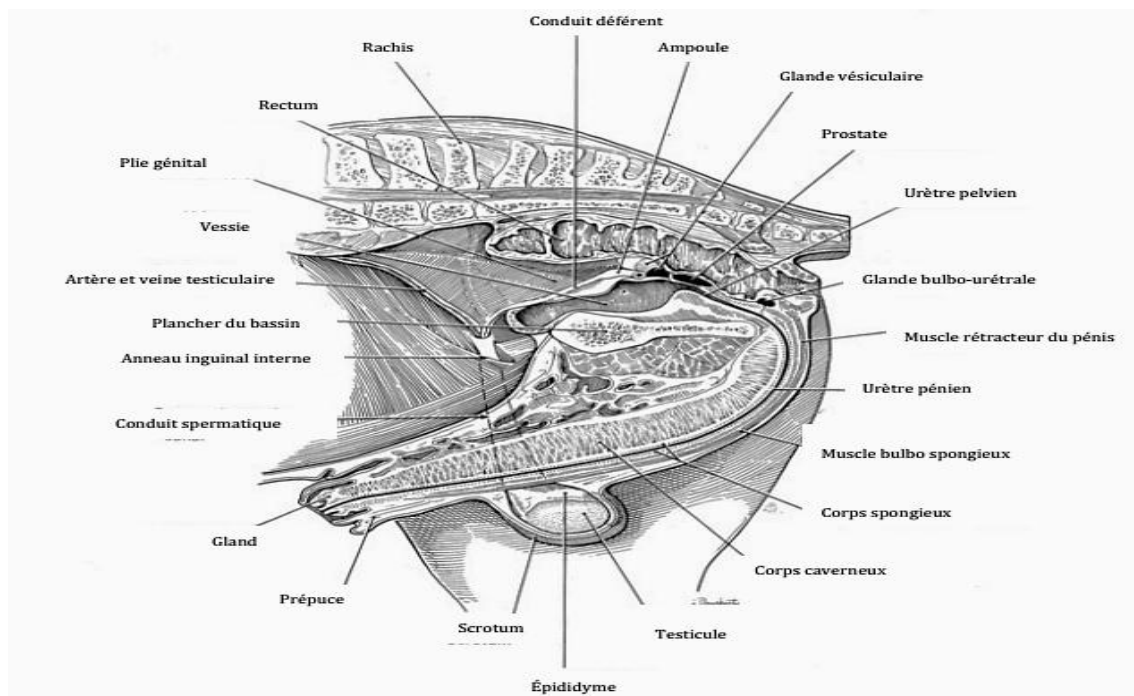


Figure 01 : Dessin du tractus reproductif de l'étalon vue en coupe sagittale (MC. Kinnon A.1993).

I. La partie glandulaire (Testicules)

I.1. Topographie des testicules

Les testicules sont des organes pairs dont la taille et le poids sont proportionnels au poids de l'animal, ils se différencient près des reins, mais ils subissent plus ou moins tôt par rapport à la naissance, une migration qui les amène à la périphérie du corps à fin que la température soit inférieure à celle du corps pour la production de spermatozoïdes féconds (**Florence Batellier ; 2005**).

Les testicules sont des organes parenchymateux constitués de tissu conjonctif lâche, formant l'albuginée, et de nombreux lobules divisés eux même en tubes séminifères contournés et en tissu interstitiel. Ils sont alors de forme ovoïde, suspendus en position horizontale par le scrotum en regard de la région pelvienne de

L'étalon. Ils sont responsables de la production des spermatozoïdes et de la sécrétion de testostérone (**Tibary et al, 2005**).

Le testicule gauche est en général situé un peu plus bas et un peu plus caudalement que le droit, l'albuginée est relativement épaisse et la pulpe brune jaunâtre ou grisâtre, le mediastinum testis est peu développé, beaucoup plus rapproché du bord épидидymaire que le bord libre. Il est parcouru par une forte veine longitudinale (**Barone 2001**).

Les ongulés (comme les équidés) sont dits exorchides permanents, car la migration des testicules est irréversible et ils se situent près de l'aîne chez le cheval (**Florence Batellier ; 2005**).

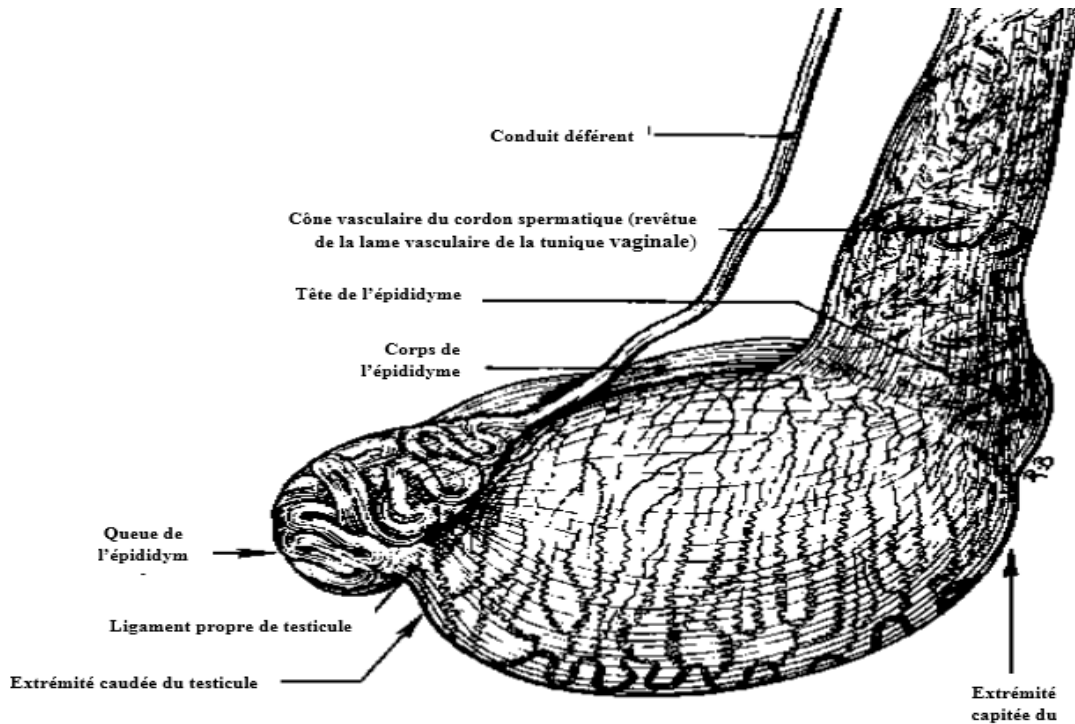


Figure 02 : Testicule et épидидyme gauche d'un étalon (Barone, 2001)

I.2. Anatomie des testicules

La taille des testicules varie de **8 à 14 cm** de longueur pour **5 à 8 cm** de largeur suivant les individus. Ils peuvent peser de **225 à 350** grammes chacun. Leur taille et poids augmente proportionnellement à ceux de l'individu jusqu'à environ l'âge 5ans (**Chirent Mylène ; 2015**).

I.2.1. Organisation externe des testicules

A. Les enveloppes testiculaires superficielles

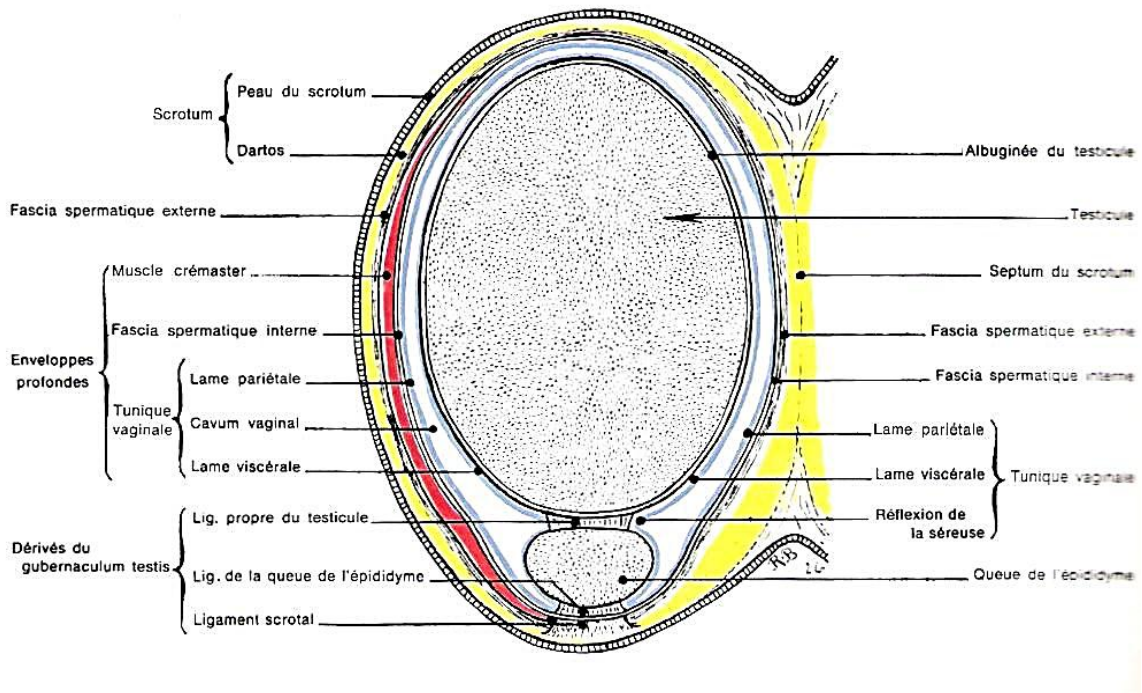


Figure 03 : Le testicule et ses enveloppes, conformation externe (Barone, 2001).

a. Scrotum

Le scrotum est une enveloppe superficielle constituée d'une fine couche de peau recouvrant diverses couches fibro-élastiques et musculaires, dont la plus importante est le dartos, il est volumineux mais relativement peu détaché et à peine rétrécit à sa base (**Barone 2001**).

La peau de scrotum représente l'enveloppe cutanée unique commune aux deux testicules. Elle est mince, glabre, très pigmentée, noirâtre et adhérente au dartos, recouverte d'un duvet court et très fin, et très riche en glandes sébacées dont leurs sécrétions lui donnent une consistance onctueuse (**Meskini Zakaria ; 2017 ; Barone 2001**), elle joue un rôle thermorégulateur grâce à sa finesse (**Florence Batellier ; 2005**).

Le dartos forme un sac autour de chaque testicule, constitué de fibres musculaires lisses et de fibres élastiques, il est relativement fort et délègue des expansions nettes dans le prépuce, sur le périnée et autour de la région inguinale (**Barone 2001**) ; il a un rôle

thermorégulateur grâce aux contractions musculaires qui provoquent des rides de scrotum en cas de froid (**Florence Batellier ; 2005**).

b. Le fascia spermatique externe ou tunique celluleuse

Il représente l'enveloppe intermédiaire de testicule, c'est un tissu conjonctif très mobile situé entre les enveloppes profondes et le scrotum (**Florence Batellier ; 2005**). Il permet une grande mobilité au testicule et à son sac fibreux, le protégeant contre les compressions et les chocs (**Vaissaire, 1977 ; Drion et al, 1993**). C'est dans cette couche que siègent habituellement les infiltrations pathologiques en raison de la nature dissociable de ce tissu (**Delphine ; 2003**).

B. Les enveloppes testiculaires profondes

a. Le crémaster

Est un muscle rouge et strié à contraction volontaire, épais et large, étalé sur la face externe et les bords de la gaine vaginale, il couvre les faces latérale et caudales du fascia spermatique interne. Sa contraction est à l'origine de l'ascension du testicule (**Vaissaire, 1977 ; Barone 2001**), grâce à ses contractions importantes, il éloigne ou rapproche le testicule du corps (**Florence Batellier ; 2005**).

b. Le fascia spermatique interne ou tunique fibreuse

Il forme un sac autour de chaque testicule prenant un sac dans l'abdomen et passant l'anneau inguinal. Chaque sac est formé par deux tuniques : la tunique vaginale et la tunique fibreuse de nature conjonctive, il permet la fixation du crémaster et la protection du testicule (**Florence Batellier ; 2005**).

Chez le cheval, le fascia spermatique interne est relativement épais et uni au dartos par un ligament scrotal épais et solide, son collet est relativement large (**Barone 2001**).

La séreuse vaginale est une expansion du péritoine. Elle comprend un feuillet pariétal qui tapisse la face interne de la fibreuse et un feuillet viscéral qui recouvre le testicule et le cordon testiculaire (**Drion et al, 1993**).

I.2.2. Organisation interne des testicules

On retrouve un **parenchyme**, de couleur jaune-ocre chez le cheval, qui correspond à la partie non capsulaire du testicule, entouré par une charpente fibreuse solide, l'**albuginée**, dans laquelle se trouvent les vaisseaux testiculaires. A la périphérie, recouvrant l'albuginée, se trouve un revêtement séreux, une portion de la lame viscérale de la **tunique vaginale**, il est continu avec le revêtement de l'épididyme et des mésos. Il est également très adhérent à la tunique albuginée (**Rezzi Léa ; 2016**).

L'albuginée envoie des expansions à l'intérieur du testicule : elles forment des cloisons qui délimitent des lobules testiculaires (**200 à 300**). Ces cloisons interlobulaires se rejoignent au centre du testicule, formant le mediastinum testis.

Chaque lobule est donc composé de plusieurs tubes séminifères entre lesquels se trouve un tissu conjonctif lâche très vascularisé. C'est au sein de ce tissu interstitiel que l'on trouve les cellules de Leydig (**Akerejola, 1978 ; Allison N, 1999**).

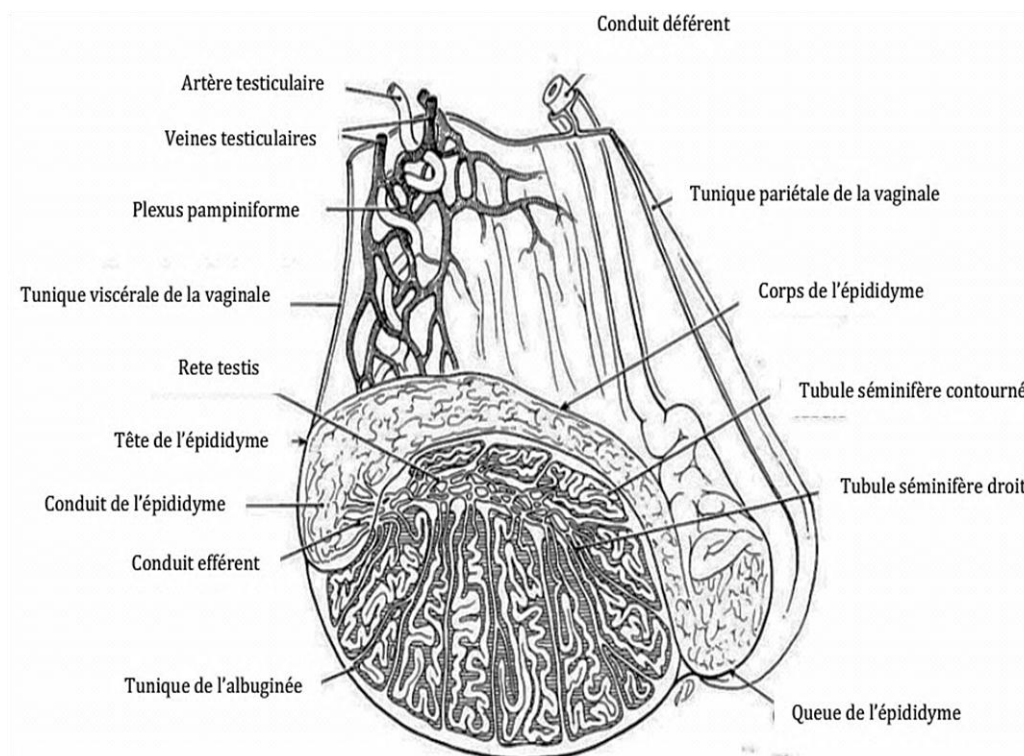


Figure 04 : conformation intérieure et structure du testicule de l'étalon (Picket B.W. 1993)

A. Les tubes séminifères

Chaque lobule du parenchyme testiculaire regroupe deux à quatre tubes séminifères contournés, siège de la spermatogénèse. Ces tubes sont fortement intriqués et échangent des anastomoses ; ils sont collectés par les tubes séminifères droits, situés au sommet de chaque lobule. (**Barone, 1956**).

À la sortie d'un lobule, les tubes séminifères se jettent dans un tube droit dont la paroi ne comporte plus que des cellules cubiques, homologues des cellules de sertoli, et reposant sur une lame basale. Dans le corps de highmore, les tubes droits s'anastomosent et forment un réseau de canaux, le rete-testis qui se dirige vers la tête de l'épididyme.

Chaque tube séminifère, fortement pelotonné sur lui-même, peut mesurer jusqu'à **2 à 3 m** de long chez les grandes espèces et **120 à 300 µm** de diamètre (**Florence Batellier ; 2005**).

Autour d'une lumière centrale pouvant contenir des spermatozoïdes, on observe sur la coupe transversale d'un tube un épithélium stratifié reposant sur une lame basale, cet épithélium assure la spermatogénèse, il comporte deux types de cellules :

a. Les cellules de sertoli

Ce sont des cellules somatiques à fonction identique et aux structures semblables à celles de tous les vertébrés (**Thibault et al, 1998**). Elles ont une forme pyramidale reposant sur la membrane basale. Les cellules de Sertoli s'étendent sur la hauteur du tube séminifère et s'unissent, d'une part, entre elles par des jonctions serrées, et d'autre part, avec les cellules germinales par des jonctions d'ancrages (**Dadoune et Demoulin, 2001**).

Les cellules de Sertoli possèdent un rôle nourricier fondamental ainsi qu'un rôle de nettoyage. En effet, elles permettent la résorption des corps résiduels et la phagocytose des spermatozoïdes en dégénérescence. Sous l'influence de la FSH (**follicule Stimulating hormon**), elles produisent de nombreuses molécules telles que l'**ABP (Androgen Binding Protein : protéine qui se lie à la testostérone et en augmente la solubilité)**, l'inhibine, l'activine, les activateurs du plasminogène, la transferrine, l'œstradiol, ainsi que des facteurs de croissance. Ces molécules sont ensuite déversées dans l'épididyme et permettant la maturation et la nutrition des spermatozoïdes (**Noakes et al. 2009**).

b. Les cellules germinales aux différents stades de leur évolution

Sont les spermatogonies, les spermatocytes, les spermatides et les spermatozoïdes dérivant toutes des gonocytes.

➤ **Les spermatogonies**

Situées près de la membrane basale, ces cellules ont un noyau arrondi, foncé à chromatine finement dispersée, et désignées par **Ad** (Dark, type A). Par mitose, elles donnent une spermatogonie **Ad** et une spermatogonie **Ap** (pâle, type A) appelée aussi « poussiéreuse » ayant une chromatine plus claire toujours finement dispersée. La division de celle-ci aboutit aux spermatogonies **B** ou « croûteuses ». Les spermatogonies croûteuses se divisent une à trois fois pour donner des « spermatocytes du premier ordre » ou « spermatocytes I » (George, 1996).

➤ **Les spermatozoïdes**

Le spermatozoïde est le résultat final de la spermatogénèse qui se caractérise par plusieurs étapes de différenciation et de multiplication des cellules de la lignée germinale à partir des spermatogonies ou cellules initiales en aboutissant à la production des spermatozoïdes.

C'est une cellule hautement différenciée, à n chromosomes, de 50 à 80 µm de longueur comportant trois parties : la tête, le col et le flagelle avec ses trois pièces : pièce intermédiaire, pièce principale et pièce terminale (Florence Batellier ; 2005).

Le flagelle, par ses mouvements, est à l'origine de la motilité des spermatozoïdes liée à leur pouvoir fécondant, car les mitochondries assurent les phosphorylations oxydatives du fructose présent dans le liquide séminal fournissant l'énergie nécessaire aux mouvements de la queue, tandis que les structures de L'axonème ont des propriétés contractiles. Ainsi, les microtubules périphériques sont riches en ATPase (Mc Donald, 1980 ; Albert et Jean, 2001).

B. Le tissu interstitiel

Il est constitué de de tissu conjonctif dans lequel se trouve des petits amas de cellules endocrines : les cellules de Leydig, situées le long des capillaires sanguins. Ces cellules assurent la sécrétion d'hormones sexuelles males.

La production de testostérone par les cellules de Leydig est contrôlée par une gonadotropine, l'hormone LH (Luteinizing hormon). Une concentration basse en testostérone induit une augmentation de la sécrétion de LH par la glande pituitaire antérieure. Cette augmentation de LH entraîne la sécrétion de testostérone par les testicules. Il existe un rétrocontrôle négatif entre la LH et la testostérone. La testostérone diffuse du tissu interstitiel jusqu'aux tubes séminifères, où elle agit sur le bon déroulement de la spermatogenèse par le maintien du processus de méiose (**Reece 1997**).

C. Vascularisation et innervation des testicules

Le testicule reçoit sa vascularisation de l'artère testiculaire qui provient de l'aorte abdominale en regard de la 4^{ème} vertèbre lombaire près du départ de l'artère mésentérique caudale. Ce vaisseau gagne l'anneau vaginal après avoir longé la paroi abdominale et passe dans le bord crânial du mésorchium. Il a alors un trajet de plus en plus flexueux au sein du cône vasculaire. L'artère testiculaire délègue un rameau épидидymaire avant d'atteindre le mésorchium distal.

La veine testiculaire ne se constitue qu'à distance de la glande, au voisinage de l'anneau vaginal. Dans le testicule, les lobules sont drainés par des veines superficielles et des veines profondes. La veine testiculaire se continue ensuite dans le cordon par une grosse « **veine droite funiculaire** » qui, enlacée par les flexuosités de l'artère testiculaire, se poursuit elle-même par la veine testiculaire après avoir drainé le plexus pampiniforme (**Delphine ; 2003**).

Les nerfs proviennent principalement du plexus mésentérique caudal et forment le plexus testiculaire. Ils se distribuent dans l'albuginée par des terminaisons sensibles libres. Il semblerait que les fibres nerveuses ne pénètrent pas dans les tubes séminifères (**Barone 2001**).

II. La partie tubaire (excrétrice)

II.1. Les voies spermatiques intra-testiculaires

Les voies de conduction spermatique testiculaires sont formées par les tubes droits prolongés par le rête testis d'où émergent une vingtaine de canaux efférents. Ces conduits quittent le testicule en traversant l'albuginée et convergent ensuite pour former la tête de l'épididyme (**Barone 2001**).

- **Les tubes droits** : courts et rectilignes, ils prolongent les tubes séminifères et sont bordés par un tissu épithélial simple formé de cellules cubiques qui sont équivalentes aux cellules de Sertoli des tubes séminifères. Au niveau des tubes droits, on ne trouve par contre plus de cellules de la lignée germinale, à l'exception d'amas de spermatozoïdes en cours de migration.
- **Le rête testis** : est bordé d'un épithélium simple et cubique
- **Les canaux efférents** : ils cheminent dans le tissu conjonctif. Après la traversée de l'albuginée, ils prennent le nom de cônes efférents qui, par fusion, forment le canal épидидymaire unique. Ils ont un rôle de conduction et de progression des spermatozoïdes.

Le liquide du rête testis véhicule des spermatozoïdes immobiles. Il ne serait qu'une sécrétion tubulaire remaniée, probablement du fait d'échanges avec les veines testiculaires superficielles (**Thibault C. ; 2001**).

II.2. Les voies spermatiques extra-testiculaires

II.2.1. L'épididyme

L'épididyme est un organe allongé, qui suit le bord supérieur du testicule. Il reçoit de l'extrémité capitée de la glande testiculaire les canalicules efférents et se continue caudalement par le canal déférent. Il joue un rôle important dans le stockage des spermatozoïdes, qui subissent une maturation lors de sa traversée. La longueur de l'organe en place est de **12 à 13** centimètres mais en réalité, l'épididyme est formé par un tube très flexueux logé à l'intérieur d'une gaine contentive : une fois totalement déplié, ce tube atteint chez le cheval une longueur moyenne de **70 à 80 mètres** (**Barone, 1956**).

L'épididyme est constitué par un long système canaliculaire pelotonné à l'intérieur d'une membrane albuginée, qui fait suite à la tunique albuginée du testicule. Cette membrane se réduit peu à peu à un mince tissu conjonctif sous-séreux à l'origine du canal déférent. Le système canaliculaire est d'abord formé par les canalicules efférents issus de la glande testiculaire, puis ceux-ci se rejoignent et constituent un canal unique : le canal épидидymaire dont les circonvolutions forment la quasi-totalité du corps et de la queue de l'épididyme (**Barone, 1956**).

A. Le canal déférent

Il est dans le prolongement de la queue de l'épididyme et accompagne le cône vasculaire à travers le canal vaginal. Il chemine à la face médiale du mésorchium porté par le mesoductus deferens. Il est long de **60 à 70 cm**. Sa partie initiale est très flexueuse puis il devient rapidement rectiligne et remonte dans la région inguinale. Après avoir cheminé dans le cordon spermatique, le conduit déférent se porte, au-delà de l'anneau vaginal, sur le côté de la cavité pelvienne puis à la face dorsale de la vessie pour déboucher dans la portion initiale de la partie pelvienne de l'urètre (**Delphine ; 2003**).

B. Les glandes vésiculaires

Ce sont des glandes tubulo-alvéolaires. Les vésicules séminales (ou glandes vésiculaires) et le conduit déférent se terminent par un conduit commun : le conduit éjaculateur qui débouche ensuite dans l'urètre. Les cellules épithéliales des vésicules séminales sécrètent des protéines (enzymes, inhibiteurs d'enzymes, protéines structurales) et un mucus gélatineux, épais et blanc, composé entre autres de fructose et de prostaglandines. Les prostaglandines jouent un rôle dans les contractions des voies génitales femelles, et favorisent donc la migration des spermatozoïdes dans ces voies femelles (**Barone R. 2001 ; Thibault C. ; 2001**).

III. La partie uro-génitale

III.1. L'urètre d'étalon

L'urètre du cheval est un long conduit impair de **60 à 70 cm**, ayant pour fonction l'excrétion de l'urine et aussi celle du sperme. Il fait suite au col de la vessie ; près de son origine, il reçoit le débouché des voies spermatiques. Il longe le plancher pelvien, puis

sort du bassin et se poursuit dans le pénis, à l'extrémité duquel il se termine par le méat urinaire (**Barone ; 2001**).

A. L'urètre pelvien

C'est la partie la plus proximale de l'urètre, elle est dite intra-pelvienne : d'une longueur seulement de 10 à 12 cm, elle est dépourvue de formations érectiles mais présente des glandes annexes importantes (**Barone ; 2001**).

L'urètre pelvien est limité par deux rétrécissements : le premier, proximal, correspond au col de la vessie et le second, caudal, correspond à l'isthme de l'urètre. Ces deux rétrécissements délimitent une partie plus large appelée fosse prostatique, au niveau de laquelle se trouvent les orifices éjaculateurs, dans lesquels s'abouchent en commun les canaux déférents et les vésicules séminales. C'est également au niveau de la fosse prostatique que se trouvent les orifices des canaux excréteurs de la prostate (**Barone, 2001 ; Roger, 2009**).

B. L'urètre pénien

Il représente la partie distale de l'urètre, dite extra-pelvienne ou pénienne, elle commence par un bulbe du pénis long de **8 à 10 cm** et assez peu renflé, sa largeur n'excédant pas **5 à 6 cm**, alors que le corps spongieux à un diamètre extérieur de **2,5 cm** et, au contraire de la portion précédente, elle est entourée de tissu érectile mais dépourvue de glandes annexes (**Barone, 2001**).

La portion pénienne comporte à son origine les orifices excréteurs des glandes bulbo-urétrales, encore appelées glandes de Cowper, et se situe au sein du corps spongieux (**Barone, 2001 ; Roger, 2009**).

III.2. Glandes annexées à l'urètre

A l'urètre sont annexées des glandes dont les sécrétions sont déversées au moment de l'éjaculation et diluent le sperme, lui donnant ainsi sa composition finale. L'une de ces glandes est impaire et volumineuse : il s'agit de la prostate. Les autres, plus petites et paires, constituent les glandes bulbo-urétrales (**Barone ; 2001**).

A. La prostate

La prostate est une glande impaire, volumineuse, ferme et constituée de deux lobes réunis par un isthme. Elle se situe dorsalement à la terminaison de la vésicule séminale et à la partie terminale du canal déférent. Elle résulte en fait de l'agglomération de glandules multiples, unies par un stroma commun, mais débouchant par des conduits distincts (**10 à 20** de chaque côté, chez le Cheval), dans la partie initiale de l'urètre (**Barone ; 2001**).

Les sécrétions prostatiques représentent **20 à 30 %** du volume éjaculé, et sont déversées dans la lumière puis sont acheminées par des canaux dans l'urètre. Elles sont riches en acides aminés et en enzymes (phosphatases alcalines et acides). Elles permettent de neutraliser l'acidité liée au métabolisme des spermatozoïdes. Cette acidité est due à la production de lactate de **CO₂** et déclenche la mobilité des spermatozoïdes. L'activité de la prostate est sous la dépendance d'androgènes (**Thibault ; 2001**).

B. Les glandes de Cowper

Les glandes bulbo urétrales sont au nombre de deux, elles se situent crânialement et dorsalement à l'arcade ischiatique, de consistance ferme et de texture plus dense que la prostate. Leur taille est d'environ **4 à 5 cm** de diamètre. Elles sont constituées de lobules responsables de la sécrétion dans l'urètre pelvien d'une partie minoritaire du plasma séminal, nécessaire à la formation du bouchon muqueux ans les voies génitales femelle (**Chirent Mylène ; 2015**).

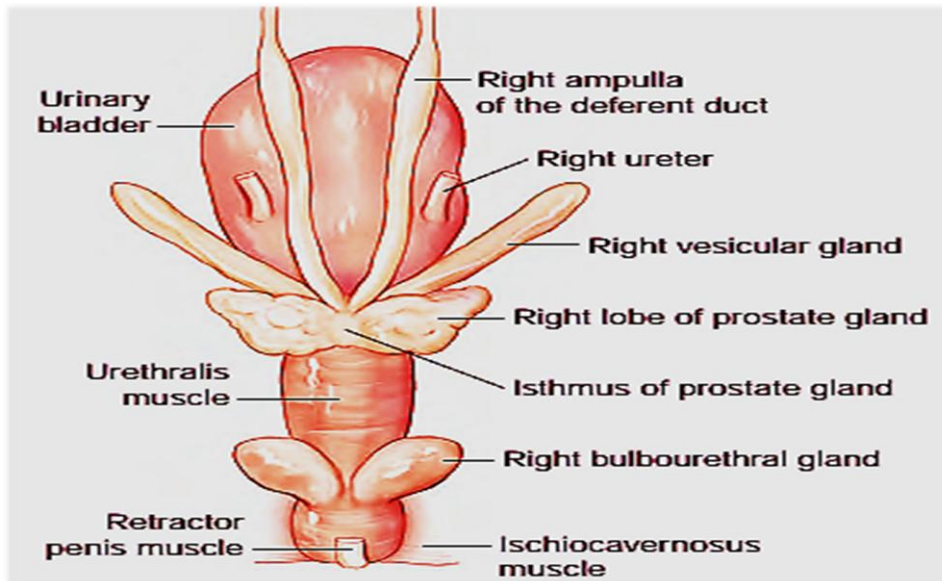


Figure 05 : glandes génitales accessoires de l'étalon, vue dorsale (P.L. Senger, Ph. D., 2003).

C. La verge ou pénis

Le pénis est l'organe copulateur du mâle ; il est essentiellement constitué de formations érectiles (corps caverneux, corps spongieux de l'urètre et du gland). Chez les équidés, il commence au niveau de l'arcade ischiale ; il descend entre les deux cuisses, passe entre les deux sacs dartoïques et se prolonge sous le ventre, où sa partie libre est contenue dans le fourreau. En effet, cet organe comporte deux parties : une partie fixe, proximale, qui est maintenue par un système d'aponévrose et de ligaments et une partie libre, mobile et détachée, qui peut être portée dans les voies génitales femelles lors de l'érection (**Barone ; 2001**).

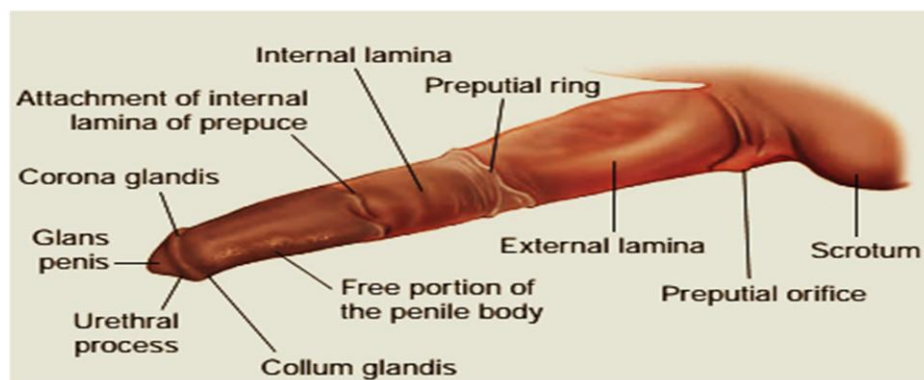


Figure 06 : structure de pénis et du prépuce de l'étalon (P.L. Senger, Ph. D., 2003).

Chapitre II
Production de la semence
chez l'étalon

I. De la spermatogénèse à l'éjaculation

I.1. Spermatogénèse et spermiogénèse

I.1.1. Spermatogénèse

La spermatogénèse est un phénomène physiologique permettant de produire les spermatozoïdes à partir de cellules souches appelées spermatogonies. La spermatogénèse se déroule dans les tubes séminifères eux-mêmes situés dans le parenchyme testiculaires (**Johnson et Al.1997**).

La spermatogénèse débute entre **18 et 24 mois** d'âge selon les étalons et la saison et se poursuit tout au long de la vie de l'animal. Le temps nécessaire à la transformation du stade de spermatogonie au stade de spermatozoïde est d'environ **57 jours** (**Tibary et al. 2005**).

Les spermatogonies sont situées au niveau du compartiment basal du tube séminifère, une spermatogonie souche donne après quatre divisions mitotiques **16** spermatocytes primaires (**I**) à **2n** chromosome. Chaque spermatocyte I subit en suite une première division méiotique donnant au total **64** spermatocytes secondaires (**II**) à n chromosomes. Finalement, chaque spermatocytes **II** subit également une Méiose donnant chacun deux spermatides haploïdes. Enfin, chaque spermatide va entrer en phase de maturation appelée spermiogénèse afin de donner un spermatozoïde mature (**Chirent Mylène ; 2015**).

La production de spermatozoïdes quotidienne augmente significativement lors de la saison de reproduction de Mars à Aout et Avoisine les **19** millions de spermatozoïdes par jour par gramme de parenchyme testiculaire contre **15** millions en dehors de la période de reproduction (**Mckinnon et al. 1993**).

I.1.2. Spermiogénèse

La spermiogénèse dure **18,6** jours chez l'étalon. Elle se caractérise par l'acquisition de fonctions : à la fin de cette étape, les spermatides sont complètement différenciées. Elles sont alors nommées spermatozoïdes quand elles quittent l'épithélium spermatogène (**Amann, 1993**).

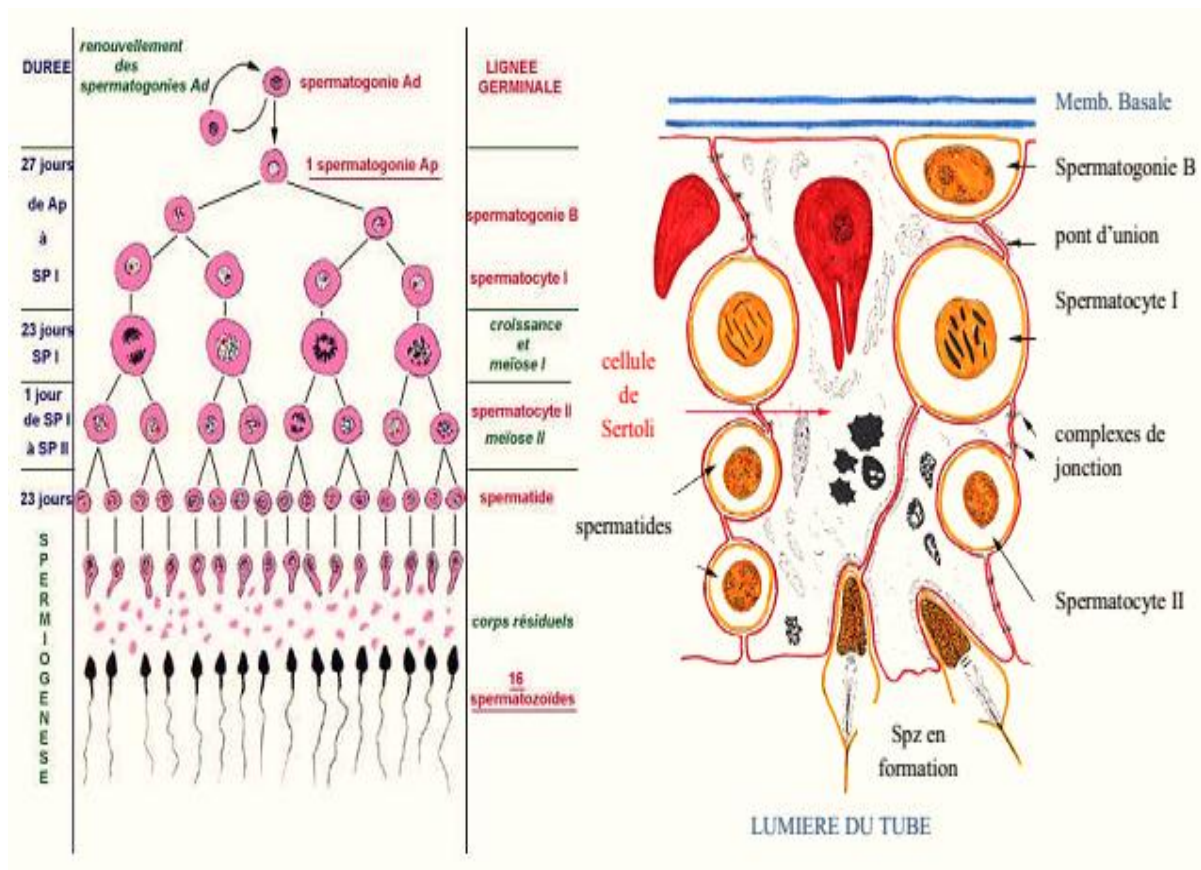


Figure 07 : la spermatogénèse (Marie Allimant, 2010)

I.2. Structure de spermatozoïde

Le spermatozoïde transporte l'information génétique dans le tractus génital femelle et la délivre à l'intérieur de l'ovocyte. Afin d'accomplir cette mission, le spermatozoïde est hautement différencié. La taille et la forme du spermatozoïde varient entre espèces (Senger, 2005). Chez l'étalon, il mesure **60 µm** de long sur **2,7 µm** de large (Amann et Graham, 2011). Morphologiquement, le spermatozoïde des mammifères est divisé en deux parties (Senger, 2005) : (i) la tête, comprend l'acrosome, le chapeau nucléaire et le noyau cellulaire et (ii) la queue ou flagelle, comprend la pièce intermédiaire, la pièce principale et la pièce terminale.

➤ **La membrane cytoplasmique**

La membrane cytoplasmique constitue la barrière avec le milieu extérieur elle n'est pas homogène mais est divisée en de nombreux microdomaines (mosaïque) où des protéines spécifiques sont fixées (**Gadella, 2008**). De nature lipidique, elle peut être modifiée par le milieu avec lequel des échanges sont possibles (**Ricker et al, 2006; Gadella, 2007; 2008b**). Elle est sensible aux dommages causés par la congélation et des formes activées de l'oxygène (**FAO**) (**Brinsko et al., 2003 ; Neild et al., 2003 ; Neild et al., 2005**).

➤ **La tête**

Le cytoplasme est très peu présent et l'essentiel de l'espace est occupé par le noyau et l'acrosome. Le noyau présente exclusivement de l'hétérochromatine, qui est particulièrement condensée grâce à des protéines particulières : les protamines. Il s'agit de protéines riches en arginine et cystéine capables d'établir entre elles des ponts disulfures. Sous cette forme la chromatine est également protégée contre les altérations possibles lors du stockage ou lors du transfert dans les voies génitales femelles. L'acrosome est une poche limitée par une membrane. A l'avant, la membrane est accolée contre la membrane plasmique et à l'arrière, la membrane épouse la forme du noyau. Son contenu est riche en enzymes protéolytiques (**Knobil. E ; 1999**).

➤ **Le flagelle**

Le flagelle est la formation locomotrice qui permet d'amener le contenu chromosomique mâle jusqu'au gamète femelle. La pièce principale est constituée de neuf faisceaux de fibres denses ainsi que d'une gaine protéique fibreuse périphérique. La pièce terminale n'est constituée que de l'axonème enfermé dans la membrane plasmique.

Le cou ou pièce intermédiaire, comporte deux centrioles : le centriole proximal, bien individualisé et situé derrière le noyau et le centriole distal, incorporé à la base de l'axonème. La pièce intermédiaire comporte l'axonème dans sa partie centrale entourée d'un faisceau de fibres et d'un manchon de mitochondries. Ces dernières sont le reflet d'un métabolisme aérobie et assurent une production importante d'ATP (**Adénosine Tri Phosphate**) utilisée dans le fonctionnement de l'axonème. Chez les mammifères l'approvisionnement

énergétique, en l'absence de toute réserve intracellulaire, est assuré par le liquide séminal (sous forme de fructose) (Knobil. E ; 1999).

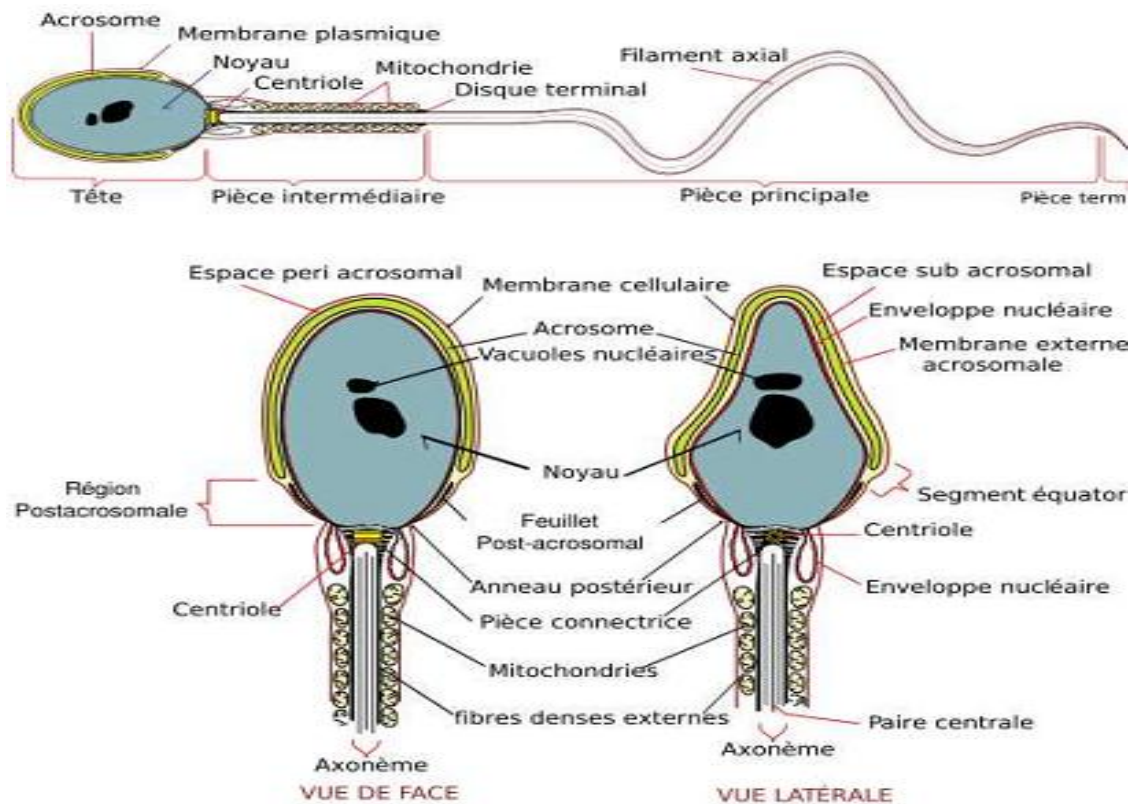


Figure 08: structure d'un spermatozoïde (Marie Allimant, 2010)

I.3. Maturation de spermatozoïde et capacitation

I.3.1. Maturation

Le spermatozoïde équin séjourne au minimum 4,1 jours dans l'épididyme (Senger, 2005 ; Amann, 2011), où des modifications physiologiques et morphologiques vont avoir lieu. Durant ce transit, Le liquide présent à l'entrée de l'épididyme va presque entièrement être réabsorbé et il sera ensuite remplacé par une sécrétion de la partie distale de l'épididyme (Senger, 2005 ; Amann, 2011). Dans la tête de l'épididyme, les spermatozoïdes ne sont ni mobiles, ni fertiles et une gouttelette cytoplasmique proximale est présente (Senger, 2005 ; Amann, 2011). Dans le corps de l'épididyme, les spermatozoïdes acquièrent leur mobilité. L'apparition de la mobilité fait suite à l'absorption de carnitine au niveau de la tête de l'épididyme (Senger, 2005 ; Amann, 2011). À ce stade, la gouttelette cytoplasmique se trouve sur l'extrémité distale de la pièce intermédiaire (Braun et al, 1994) et les

spermatozoïdes peuvent se lier à l'ovocyte et sont capables de féconder un ovocyte (Sostaric et al, 2008).

Dans le plasma séminal, la membrane cytoplasmique de la tête va être recouverte par des protéines et des glucides du plasma séminal (Lopez et al, 2007 ; Gadella, 2008 ; Gadella et al, 2008). La dilution du milieu épидидymaire par le plasma séminal va aussi lever l'inhibition de la mobilité des spermatozoïdes (Senger, 2005).

Seuls les spermatozoïdes présents dans la partie distale de l'épididyme sont éjaculés. Les préliminaires sexuels provoquant une libération d'ocytocine, les contractions des muscles lisses vont amener les spermatozoïdes jusqu'à l'urètre pelvien où ils seront stockés avant l'éjaculation.

I.3.2. Capacitation

Les spermatozoïdes subissent la capacitation dans les voies génitales femelles : ils achèvent leur maturation et acquièrent leur pouvoir fécondant. Des enzymes protéolytiques produites par les voies génitales femelles libèrent les sites de reconnaissance de l'ovocyte, jusque-là masqués lors du passage dans l'épididyme. Des remaniements membranaires interviennent, en particulier la diminution du ratio cholestérol/phospholipide qui rend la membrane plasmique très instable et rend possible l'exocytose de l'acrosome (Thibault. C, 2001 ; Heymon. Y ; 2005).

II. Caractéristiques de la semence d'étalon

II.1. Aspect externe

II.1.1. Volume

L'éjaculat de l'étalon est composé de deux fractions majeures : une fraction liquide (contenant la majorité des spermatozoïdes) et une fraction gélatineuse. Si le tube collecteur dispose d'un filtre, le volume de la fraction liquide peut être lu directement sur ce tube collecteur. Par contre, le volume de la fraction gélatineuse doit être établi à partir de la portion retenue par le filtre. Certains étalons ont des éjaculats complètement dépourvus de gel (Tibary A ; 2005, Blanchard. TL ; 2003. Heymon Y ; 2005).

II.1.2. Couleur et consistance

La couleur normale de l'éjaculat équin est grisâtre à blanchâtre selon la concentration en spermatozoïdes. Cette couleur peut devenir rose, rougeâtre ou rouge vif lorsque le sperme contient du sang (hémospermie). Une couleur jaunâtre peut signaler la présence d'urine (urospermie) ou de pus (pyospermie). L'éjaculat est homogène et de consistance aqueuse sauf lorsqu'il contient une partie de la fraction gélatineuse. Il peut paraître trouble (Tibary A ; 2005, Blanchard. TL ; 2003. Heymon Y ; 2005).

Pour les étalons de sang (moyenne sur 222 étalons des Haras Nationaux), les autres principales caractéristiques du sperme et de sa production sont regroupées dans le **tableau 01** (Haras nationaux, 2004).

Tableau 01 : Caractéristiques séminales de 222 étalons de sang des Haras Nationaux

Volume (ml)	40,5 +/- 20,0
Concentration (10⁶spermatozoïdes/ml)	155 +/- 71,0
Nombre total (10⁹spermatozoïdes)	5,6 +/- 3,0
PH	7,35 + 0,20
% de spermatozoïdes vivants	76,2 +/- 9,8



Figure 09 : aspect du sperme d'étalon après centrifugation (Marie Allimant, 2010)

II.2. Composition chimique

La composition chimique du sperme est la suivante :

- eau (**80%**)
- matière organique (**6%**)
- ions (**calcium, phosphate...**)
- lipides
- glucides (**fructose**)
- albumines et globulines
- bases aminées

II.3. Plasma séminal

La semence est constituée de spermatozoïdes suspendus dans un fluide appelé plasma séminal. C'est un fluide complexe qui assure l'apport de substrats énergétiques aux spermatozoïdes qui en étaient largement dépourvus lors de leur stockage dans l'épididyme. De plus, il permet l'activation de la motilité progressive des gamètes qui y sont diluées, leur transfert dans le tractus génital femelle lors de l'éjaculation (**Dacheux et al. 2001**).

Les sécrétions des glandes annexes constituent la majeure partie de la fraction liquide de l'éjaculat, de **50 à 95%** du volume total du liquide séminal suivant les espèces. Certains éléments du liquide séminal proviennent de la filtration du plasma sanguin tandis que d'autres sont produits par les glandes sexuelles (**Dacheux et al. 2001**). Le plasma séminal joue également le rôle de substance tampon pour les spermatozoïdes.

Son pH est légèrement alcalin, entre **7,2 et 7,8**, et permet de neutraliser l'environnement acide du vagin (**Prins 1998**). Certaines études ont montré que les substances contenues dans le plasma séminal ne sont pas indispensables à la fécondation de l'ovocyte. En effet, aucune différence n'a été observée entre les taux de fécondation obtenus avec des spermatozoïdes prélevés directement dans la queue de l'épididyme ou avec des spermatozo

-ides éjaculés. Cependant, in vivo, les différents composés contenus dans le plasma séminal possèdent bien une influence positive sur le pouvoir fécondant du spermatozoïde (**Dacheux et al. 2001**).

Le liquide séminal est composé à **90%** d'eau et il contient également différents composants chimiques (matière organique (**6%**), ions (calcium, phosphate...), lipides, glucides (fructose), albumines et globulines, bases aminées...etc.), (**Prins 1998**).

Chapitre III
Collecte et conservation de
la semence chez l'étalon

I. Collecte de la semence

I.I. Méthodes de récolte de la semence

I.1.1. Récolte à l'aide du vagin artificiel

C'est une méthode de récolte qui présente l'avantage de se rapprocher le plus possible des conditions de l'accouplement naturel en donnant un éjaculat naturel, induit par une libido nécessaire et suffisante, et produit par un comportement physiologiquement proche du coït. C'est pourquoi elle permet d'obtenir le meilleur sperme possible à un moment donné. Dont le principe est de reproduire à l'aide du vagin artificiel (l'ensemble des sensations procurées par les voies génitales femelles lors du coït (chaleur, pression, lubrification)).

Chez l'étalon, la récolte par vagin artificiel constitue la méthode de choix, tandis que la nécessité de la présence d'une jument en plein œstrus pour jouer le rôle du boute-en-train afin d'initier la suite d'événements menant à l'accouplement représente l'un des inconvénients de cette technique, dont la nécessité pour le collecteur d'être très proche de l'animal peut se révéler dangereuse pour ce dernier (**Marc Stéphanie, 2015**).

A. Description

Le vagin artificiel a une forme et des dimensions en rapport avec l'espèce pour laquelle il est conçu, en tenant compte de la conformation du pénis et de la taille de l'animal.

C'est un appareil simple et pratique, il est constitué de :

- **Un manchon extérieur** : c'est un cylindre en caoutchouc rigide, dont la longueur et le diamètre intérieur varient selon le type du vagin artificiel utilisé lors de la collecte chez l'étalon.
- **Un manchon intérieur** : c'est une capote amovible et gonflable, également en caoutchouc. La paroi qui le constitue est donc double et l'espace entre les deux manchons peut être rempli d'eau chaude en quantité suffisante à l'aide d'une valve extérieure de façon à ce que la température de la lumière du vagin artificiel soit comprise entre 45 et 48°C et la pression soit également équivalente à celle du vagin de la femelle.
- **Un cône en silicone** : qui prolonge le vagin artificiel, à l'extrémité duquel est fixé un tube de collecte en verre ou en plastic gradué pour recueillir le sperme, et l'autre extrémité servant à introduire le pénis est lubrifiée (**Noakes et al. 2009**).
-

- Dans beaucoup de cas, le vagin artificiel est protégé d'un revêtement assurant, d'une part, la préservation de l'échantillon du choc thermique, et d'autre part, la protection du dispositif d'éventuels dommages (**Shoenian, 2005**).

B. Choix de type du vagin artificiel

Le choix du vagin artificiel et sa préparation conditionnent l'efficacité de la collecte et la qualité de la semence récoltée. De nombreux modèles de vagins artificiels sont disponibles et présentent des particularités qui sont à privilégier selon les besoins spécifiques de l'animal, le mode de traitement de la semence et la préférence du manipulateur (**Blanchard et al. 2003**).

Tous les modèles du vagin artificiel utilisés pour la collecte du sperme d'étalon sont fondamentalement similaires, en ce sens qu'ils sont dotés d'un jet d'eau qui permet de faire varier la température et la pression du manchon intérieur. Tandis que les caractéristiques spécifiques des différents types varient en longueur totale, en diamètre, facilité de manipulation, poids et lieu d'éjaculation avec les étalons (**Juan C. 2009**).

Les modèles du vagin artificiel les plus couramment utilisés et leurs principales caractéristiques sont rassemblés dans le tableau ci-dessous :

Tableau 02 : les modèles du vagin artificiel couramment utilisés et leurs caractéristiques principales (Steven P. et al. 2011).

Vagin artificiel Missouri	Vagin artificiel Colorado	Vagin artificiel Japonais (Nishikawa)
<p>-C'est le plus largement utilisé surtout aux États-Unis.</p> <p>-Peu couteux, léger, facile à assembler et à nettoyer.</p> <p>- La température interne de sa lumière peut dépasser le seuil de tolérance au sperme de 45 à 48 °C, une propriété avantageuse pour les étalons qui préfèrent les températures plus élevées.</p> <p>-La chance de contamination du sperme collecté par une fuite d'eau est très minime.</p> <p>-deux longueurs sont disponibles (16 pouces et 22 pouces), les étalons avec un grand pénis peu préférer le liner plus long.</p>	<p>-Le modèle Colorado original</p> <p>Est plus encombrant à utiliser que le modèle Missouri.</p> <p>-Il offre une bonne rétention de la chaleur du fait qu'il y a deux doublures en caoutchouc entre la chambre d'eau et la lumière du vagin.</p> <p>-Le risque de contamination du sperme collecté est aussi réduit.</p> <p>-La température doit être soigneusement réglée pour éviter tout dommage thermique excessif au sperme éjaculé car la veste d'eau est plus longue que le pénis.</p>	<p>- Il n'est plus disponible aux États-Unis.</p> <p>-Il est composé d'un petit boîtier en aluminium, avec un matériel léger facile à assembler et à nettoyer.</p> <p>-Le contact du sperme avec le liner en caoutchouc est très minime.</p> <p>-L'eau peut facilement couler ce qui réduit la pression du vagin et augmente le risque de contamination de l'eau dans l'éjaculat.</p> <p>-Des trous très ponctuels peuvent se développer dans la gaine en caoutchouc entraînant une fuite d'eau dans la lumière du vagin.</p>



Figure 10 : vagin artificiel de type Missouri (Steven P. et al. 2011).



Figure 11 : vagin artificiel de type Colorado (John Dascanio.2014)



Figure 12 : vagin artificiel de type Nishikawa (Steven P. et al. 2011).

C. Préparation du vagin artificiel

Just avant la collecte du sperme, la chemise d'eau est remplie d'eau à **45 - 50°C** pour fournir une température luminale de **44 à 48°C**, supérieure à celle du corps afin de stimuler le pénis et faciliter l'éjaculation. Et la pression doit être ajustée et adéquate pour assurer un bon contact uniforme autour du pénis et une érection complète. La température et la pression de l'eau devraient être maintenues constantes pendant la collecte, afin de favoriser une récolte maximale de semence.

La surface interne de vagin artificiel doit être lubrifiée avec un lubrifiant stérile non-péricide, un filtre approprié est placé dans le tube de collecte, qui va piéger le gel, tout en permettant le passage de la fraction sans gel dans le réceptacle séminal afin de maximiser le nombre de spermatozoïdes disponibles, et le tube doit être maintenu à une température du corps pendant la collecte et au cours de son transport au laboratoire, afin d'éviter tout choc du froid sur le sperme qui devrait à son tour être protégé de la lumière.

Le filtre contenant le gel doit être retiré immédiatement après la collecte afin d'éviter toute infiltration de gel dans la portion sans gel de l'échantillon de sperme récolté (**Steven P. et al. 2011**).

D. La collecte de sperme

La collecte de sperme avec un vagin artificiel est généralement effectuée en permettant à l'étalon de monter une jument ou un fantôme de reproduction. La jument présentant un œstrus comportemental, est couramment utilisée comme une source de montage, elle doit être bien préparée de manière à ce qu'elle tolère que l'étalon monte sans causer des dommages à elle, à l'étalon lui-même ou aux manipulateurs, et que les risques de transmission des maladies vénériennes sont minimales.

La zone de montage doit permettre une bonne assise, être libre de toute obstruction et être de niveau. Un étalon peut tomber et être blessé s'il tente de monter une jument sur une pente. Les zones herbeuses, humides et glissantes doivent être évitées.

Une fois que l'étalon a été taquiné à la source, le pénis en érection est lavé à l'eau tiède et séché, ce qui lui stimule davantage avec une pression de la main sur le gland et le pénis, et en veillant particulièrement à retirer les débris et le smegma de la fosse glandulaire.

L'étalon doit s'approcher de la source de montage, avec l'entraîneur et le collecteur du même côté du cheval. Une fois qu'il est monté, le pénis est dévié dans le vagin artificiel qui est maintenue au niveau de la moitié de la hanche de la source de montage, selon un angle parallèle à l'abdomen de l'étalon.

Afin que le sperme soit peu exposé à la température élevée de la chemise d'eau, le gland du pénis devrait être aussi loin que possible dans le vagin artificiel, qui doit être tenue fortement contre la source de montage d'une main, tandis que l'autre main est placée à la base du pénis. Une fois que l'éjaculation commence, le vagin est retiré du pénis tout en abaissant lentement son extrémité distale, et le filtre est retiré rapidement tout en évitant la contamination de sperme collecté par du gel (**John Dascanio. 2014 ; Steven P. et al. 2011**)

I.1.2. La récolte par éjaculation chimique

Le sperme peut être prélevé sur des étalons présentant un handicap physique ou un problème éjaculatoire selon la procédure d'éjaculation chimique, connue sous le nom « **d'éjaculation ex copula induite par un médicament** ». Les étalons reproducteurs pour lesquels cette procédure est bénéfique incluent les chevaux avec des problèmes musculo-squelettiques graves, des défauts neurologiques, une paralysie de pénis et autres problèmes (**John Dascanio. 2014**).

L'éjaculation dans la copule dépend de l'érection, de l'insertion et de la poussé. Par conséquent tout déficit d'intérêt sexuel ou de capacité d'éveil ou d'aptitude physique peu affecter la capacité à éjaculer (**Angus O. et al, 2011**).

Elle est souvent réalisée par l'administration d'une paire de médicament dans un ordre séquentiel. Le chlorhydrate d'imipramine, un antidépresseur tricyclique, est utilisé pour tenter d'abaisser le seuil d'éjaculation. Comme l'éjaculation est médiée par un mécanisme adrénergique, la xylazine hydrochloride, un agoniste adrénergiqu'a fait ses preuves dans divers protocoles généralement en association avec l'imipramine (**John Dascanio. 2014**).



Figure 13 : A : collecte de sperme éjaculé chimiquement à l'aide d'un pôle et d'une tasse attachée, B : préparation des comprimés d'imipramine pour une administration orale (John Dascanio. 2014).

➤ **La Technique :**

Un certain nombre de protocoles spécifiques ont été testés expérimentalement et ont été utilisés en clinique pour induire l'éjaculation sans aucun effort ou exposition sexuelle (McGreevy PD, 1995) :

- L'étalon doit être maintenu dans un endroit calme (par exemple, l'étable régulier de l'étalon), les distractions doivent être éliminées (bruit, circulation, piétonne, etc.).
- L'étalon est administré par voie orale à l'imipramine broyée à une dose de **2,2 mg / kg**.
- Environ **1 à 2 heures** plus tard, le chlorhydrate de xylazine est administré à une dose de **0,3 à 0,4 mg / kg** par voie intraveineuse afin d'induire l'émission de sperme ; Le chlorhydrate de xylazine peut être remplacé par du chlorhydrate de détomidine à raison de **0,01 mg / kg** par voie intraveineuse.
- L'émission passive de sperme se produit généralement dans les **3 à 5 minutes** qui suivent l'administration de la xylazine au moment où l'étalon commence à être sous sédation ou lorsque la sédation s'estompe environ **12 à 15 minutes** après l'administration. Il est courant que les testicules du scrotum présentent un mouvement ascendant au moment de l'éjaculation (contraction du crémaster et de la

tunique dartoïque). Cela peut être surveillé pour savoir quand il faut s'attendre à une éjaculation.

- Le sperme peut être capturé à l'aide d'une cupule tenue sur une longue perche ou d'un dispositif de prélèvement placé sur le prépuce et attaché au dos du cheval (**John Dascanio. 2014**).

II. Contrôle de la semence

L'évaluation de la semence après la récolte a pour but le contrôle et l'évaluation de fonctionnement testiculaire et épидидymaire, tandis que le contrôle réalisé après congélation, permet d'évaluer les dommages subis par les spermatozoïdes au cours de ce processus, et d'estimer leurs capacités fécondantes pour évaluer la qualité de la semence.

II.1. Examens macroscopiques

II.1.1. Volume

Le volume de l'éjaculat est évalué par lecture directe sur le tube de collecte gradué juste après la récolte. Celui-ci est très variable en fonction des individus, de leur âge, de leur taille, la fréquence des récoltes et la méthode de récolte. Ainsi que la saison (plus faible en hiver qu'en été) et le temps de préparation de l'étalon (une stimulation sexuelle prolongée augmente le volume sans modifier le nombre de spermatozoïdes).

La mesure du volume donne quelques indications, elle est importante pour calculer le nombre total de spermatozoïdes dans l'éjaculat mais elle n'est pas indicatrice de la qualité de la semence (**Marc Stéphanie. 2015**).

II.1.2. Couleur et aspect

Normalement, la semence présente un aspect blanc laiteux, homogène mais trouble. Elle est également inodore. La présence d'une odeur anormale peut évoquer une contamination de l'éjaculat par de l'urine, du pus ou des bactéries.

Certaines modifications de couleur peuvent orienter vers des affections spécifiques : la couleur jaune indique la présence d'urine ou la présence d'un exsudat inflammatoire ; la couleur verte met en évidence la présence de pus ; la couleur rouge ou brune indique la présence de sang respectivement en nature ou digéré (**Johnston et al. 2001**).

II.1.3. PH

Le pH de la fraction sans gel du sperme peut être mesuré rapidement à l'aide d'un papier pH, mais il est préférable d'utiliser un pH-mètre précis. Le pH doit être mesuré dès que possible après la récolte pour éviter le biais dû aux produits issus du métabolisme des spermatozoïdes. Le pH normal du sperme d'étalon varie entre **7,2 et 7,7**. Il subit des variations physiologiques selon la saison, la fréquence des éjaculations et la concentration. (Tibary A, 2005. Blanchard TL, 2003).

II.2. Examen microscopique

II.2.1. Concentration

C'est un critère important pour le jugement de la qualité de la semence, dont l'objectif est de redéterminer le nombre de spermatozoïdes par millilitre de semence pure. Elle peut être déterminée directement par comptage des spermatozoïdes au moyen d'une cellule hématimétrique, ou à l'aide d'un spectrophotomètre dans la plupart des laboratoires de reproduction équine. Comme elle peut être déterminée indirectement par comparaison visuelle du sperme à des solutions standard, ou plus récemment par des instruments d'analyses assistée par ordinateur du sperme (CASA), ou par moyen de Nucleocounter SP-100TM basé sur la technologie de la fluorescence (Meskini Zakaria. 2017 ; Angus O. et al, 2011).

A. Evaluation par utilisation d'une cellule hématimétrique

Il s'agit de la méthode la moins chère pour déterminer la concentration en spermatozoïdes de l'éjaculat et elle consiste en un comptage direct des spermatozoïdes observés individuellement.

Le sperme est tout d'abord dilué dans une solution hypertonique, comme du chlorure de sodium à **3%**, destinée à tuer les spermatozoïdes afin d'en faciliter le dénombrement. Cette dilution est effectuée dans des mélangeurs de Potain utilisés habituellement pour le comptage des cellules sanguines. Si le sperme semble concentré en spermatozoïdes à l'examen microscopique au faible grossissement, une dilution au centième voire au deux-centième est effectuée alors que si le sperme est peu concentré, une dilution au dixième voire au vingtième suffit.

Une fois la dilution effectuée, une goutte de la préparation est déposée sur une cellule hématimétrique : cellule de Neubauer, de Malassez ou de Thoma. Ce sont des lames spéciales composées d'un quadrillage très fin de compartiments d'un volume donné dans lesquels on compte simplement le nombre de spermatozoïdes présents. Le comptage est effectué à l'aide de l'objectif **x400** du microscope. Les spermatozoïdes sont dénombrés en fonction de la technique relative à chaque type de cellule. Par convention, les spermatozoïdes situés sur le bas ou sur le côté droit du carré sont pris en compte et on ignore ceux situés en haut et à gauche. On peut également ne prendre en compte que les spermatozoïdes dont la tête se trouve dans le carré en question (**Johnston et al. 2001**).

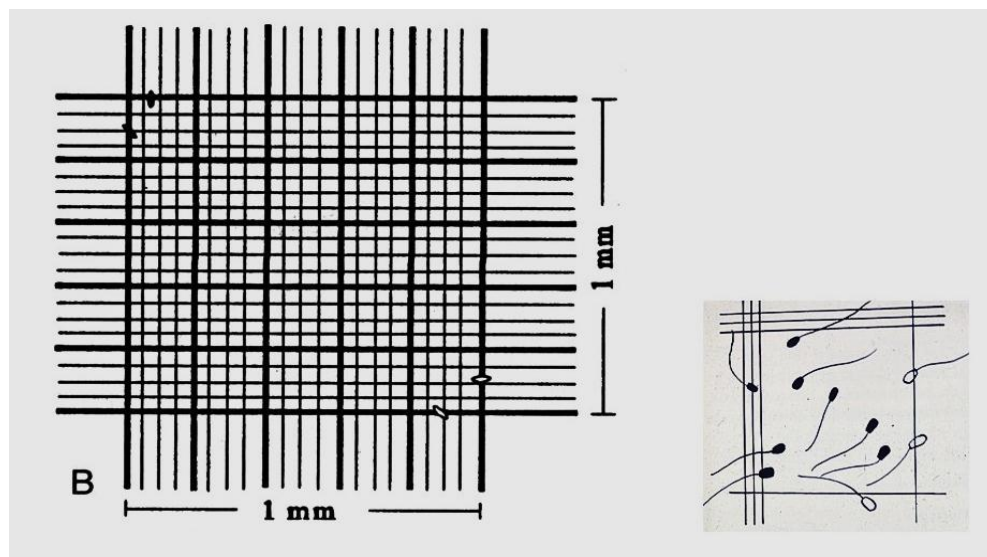


Figure 14 : Hématimètre : cellule de Thoma (<https://slideplayer.fr/slide/3395368/>).

B. Evaluation par utilisation du spectrophotomètre

L'acquisition d'un spectrophotomètre (**Figure**) est justifiée pour les praticiens spécialisés ou les grands haras dans l'espèce équine, surtout quand l'insémination artificielle est utilisée. Cette technique mesure la densité optique d'un échantillon de sperme dilué et en détermine la concentration. L'estimation de la concentration en spermatozoïdes d'un éjaculat par mesure de la densité optique doit être considérée comme assez juste et utilisable en routine pour la préparation de doses d'insémination, mais pouvant être soumise à des biais de mesure (**Allimant 2010**).



Figure 15 : photomètre Minitube avec cuvette remplie en sperme (John Dascanio. 2014).

II.2.2. La Motilité

La mobilité des spermatozoïdes, c'est-à-dire le pourcentage de spermatozoïdes mobiles, doit être évaluée le plus rapidement possible, dans les 10 à 15 minutes après la récolte. Elle peut être évaluée par observation au microscope ou de façon automatisée.

➤ **Méthode classique :**

- **Dilution :**

La mobilité des spermatozoïdes est d'abord évaluée au niveau de la Semence « **pure** » (non diluée) afin de déterminer un éventuel effet délétère du Dilueur de semence.

Sur la semence, elle apporte une indication de la performance des spermatozoïdes dans leur milieu naturel. Elle peut cependant être difficile à évaluer lors de concentration spermatique élevée de par l'agglutination de spermatozoïdes sur la lame de verre. La mobilité des spermatozoïdes est ensuite évaluée après dilution de la semence dans un dilueur adapté (Tibary A. 2005, Blanchard TL. 2003).

Un diluant à base de lait écrémé / glucose à une concentration de **25 à 50 × 10⁶/ ml** est préférable. Idéalement la motilité devrait être évaluée à **37°C** pour éviter un ralentissement des spermatozoïdes dû à leur refroidissement. Ainsi en évitant toute source de contamination ou d'exposition excessive à la chaleur, au froid, au PH et à des conditions d'hyper ou d'hypo-osmolarité. (Angus O. et al, 2011).

Il est préférable d'effectuer une dilution à une concentration définie (**par exemple 20 millions de spermatozoïdes par millilitre**) à l'aide d'un dilueur de semence identique afin de limiter les biais d'observation (**Tibary A. 2005, Blanchard TL. 2003**).

- **Evaluation visuelle :**

L'évaluation visuelle de la mobilité des spermatozoïdes est réalisée à l'aide d'un microscope à contraste de phase muni d'une plaque chauffante à 37°C (**figure**), dont une goutte de phase spermatique déposée entre lame et lamelle et comporte une estimation de :

- **La mobilité massale :** Dans un premier temps, le sperme est regardé au faible grossissement (**x10**) afin d'apprécier de façon subjective la mobilité massale, c'est-à-dire les mouvements de réunion et de dispersion des spermatozoïdes. Une note variant de **zéro à cinq** est attribuée par l'observateur (**Tableau 03**).
- **La mobilité individuelle :** Dans un second temps, le sperme est examiné au fort grossissement (**x400**) afin d'apprécier la mobilité individuelle. Le sperme doit être relativement peu concentré, afin que chaque spermatozoïde soit individualisable.

Tableau 03 : Note d'appréciation subjective de la mobilité massale des spermatozoïdes dans un échantillon (d'après : Fontbonne, 1992)

Note	Interprétation
0	Pas de mouvement
1	Spermatozoïdes en mouvement mais pas de mouvement d'ensemble
2	Ebauche de mouvements d'ensemble circulaires
3	Mouvements d'ensemble : cercles centrés sur eux-mêmes
4	Mouvements d'ensemble : vagues rondes en mouvement
5	Mouvements d'ensemble intensifiés

On distingue deux aspects :

- **La mobilité simple :** on considère tous les spermatozoïdes plus ou moins mobiles par opposition aux immobiles. Deux comptages sont réalisés par observation de quatre

champs microscopiques à fort grossissement (**X 400**). Celle-ci s'exprime en pourcentage (**note de 0 à 100%**) et reflète partiellement la qualité du sperme (**sperme de bonne qualité : plus de 70% de spermatozoïdes mobiles**).

- **La mobilité progressive** : elle permet d'affiner le déplacement réel des spermatozoïdes. La vitesse de progression est appréciée subjectivement par l'opérateur dans le champ de vision du microscope. Les spermatozoïdes peuvent avoir des mouvements oscillants (ils vibrent et n'ont pas de direction définie) et des mouvements fléchants (ils se déplacent de façon rapide et en ligne droite). Sur une Échelle de 1 à 5, on classe les spermatozoïdes en fonction de leur mouvement (**Tableau**) (**Fontbonne et al. 1992 ; Olivier Salson 2008**).

Tableau 04 : Note d'appréciation subjective de la mobilité progressive des spermatozoïdes dans un échantillon (d'après : Fontbonne, 1992)

Note	Interprétation
0	Pas de mouvement
1	Mouvements oscillants légers sans progression
2	Mouvements oscillants et progression faible et intermittente
3	Mouvements oscillants fléchant et progression lente régulière
4	Mouvements fléchant et progression régulière vers l'avant
5	Mouvements fléchant avec progression rapide vers l'avant

Ainsi, un échantillon dont la mobilité serait notée **75/70(4)** correspond à un éjaculat dont **75%** des spermatozoïdes sont mobiles, **70%** fléchants et avec une vitesse de déplacement rapide. Les pourcentages de spermatozoïdes fléchants et rapides sont souvent considérés comme étant les meilleurs critères d'analyse de la mobilité pour prédire la capacité fécondante du sperme (**Tibary A. 2005, Blanchard TL. 2003**).



Figure 16 : microscope à contraste de phase muni d'une plaque chauffante (Marie Allimant, 2010.)

II.2.3. La morphologie

L'étude de la morphologie des spermatozoïdes est réalisée à l'aide d'un microscope avec un objectif à immersion au grossissement **x1000**. Les microscopes à lumière directe peuvent être utilisés pour examiner les frottis de semence à condition que les colorants utilisés soient appropriés (**Blanchard TL. 2003**).

➤ **Coloration :**

- **A l'aide des colorants de fond :**

En pratique, l'examen morphologique des spermatozoïdes, consiste en l'observation au microscope optique d'un étalement de semence coloré à l'éosine-nigrosine ou à l'encre de l'Inde (le plus souvent), des colorants de fond. Dont Une goutte de sperme et une goutte de colorant sont mélangées sur la lame avant d'être étalées pour obtenir un frottis qui est séché à l'air puis observé au microscope avec objectif à immersion. Pour La visualisation des détails de la structure du spermatozoïde, une fixation des cellules est faite dans une solution tamponnée de formol ou dans un fixatif similaire tel que le glutaraldéhyde (**Wessel MT. 2006**).

L'éosine est un colorant entrant dans les spermatozoïdes lorsque leur membrane est lésée (**Leeb et Rennhofer, 1954 ; Bjorndahl et al, 2003**), la coloration à l'éosine-nigrosine permet donc une étude morphologique des spermatozoïdes ainsi qu'une détermination du taux

de spermatozoïdes vivants et morts. Les spermatozoïdes vivants apparaissent blancs alors que ceux qui sont morts sont colorés en rouge ou rose suite à la perméabilité de leur membrane à l'éosine. La coloration à l'encre de chine est une préparation permettant d'avoir un meilleur contraste entre les spermatozoïdes (blanc) et la lame (fond noir), (**Tibary A. 2005**).

- **A l'aide des colorants cytologiques :**

Les colorants cytologiques classiques, comme le Wright's, le Giemsa, l'hématoxyline-éosine, sont utilisés pour mettre en évidence les cellules germinales ou somatiques sur les frottis de sperme. Ils permettent une coloration différentielle des différentes parties du spermatozoïde et une identification d'autres éléments cellulaires telles que les bactéries ou les leucocytes (**Tibary A. 2005**).

➤ **Evaluation et classification :**

Les anomalies morphologiques des spermatozoïdes sont traditionnellement classées en Anomalies primaires, résultant d'une perturbation au cours de la spermatogenèse et donc ayant une origine testiculaire. Des anomalies secondaires qui sont due à des altérations au cours de leur passage dans les voies génitales excrétrices. Les anomalies tertiaires se produiraient in vitro, du fait d'une mauvaise récolte ou d'une mauvaise manipulation au laboratoire. Un minimum de 100 spermatozoïdes doit être observé pour évaluer ces défauts de morphologie (**Varner DD. 2008, Blanchard TL. 2003**), et Selon (**Amann et Graham, 2011**), la proportion de spermatozoïdes anormaux doit être inférieure à 35 %.

Actuellement, la classification consiste à répertorier les spermatozoïdes en fonction de la localisation de l'anomalie observée : têtes détachées sans queue, têtes anormales, acrosomes en bouton, gouttelettes cytoplasmiques proximales ou distales, pièces intermédiaires pliées ou irrégulières, queues coudées ou enroulées (Figure). Cela permet une observation plus explicite et plus représentative de l'ensemble des spermatozoïdes tout en évitant les hypothèses plus ou moins erronées sur l'origine de tel ou tel défaut. (**Tibary A. 2005. Varner DD. 2008, Blanchard TL. 2003**

)

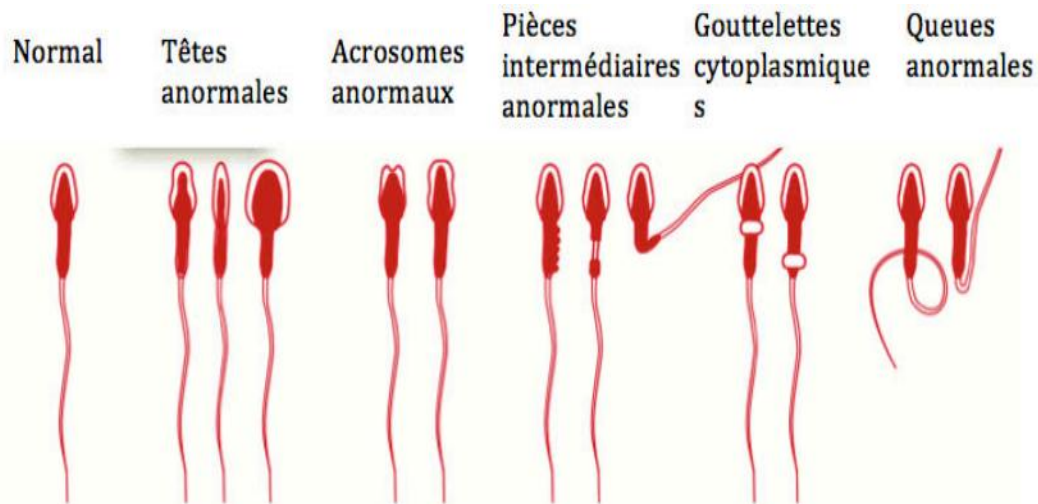


Figure 17 : Représentation schématique de la morphologie normale d'un spermatozoïde et quelque anomalie pouvant être rencontrées (Steven P. et al, 2011).

III. Conservation de la semence

La semence d'étalon peut être utilisée directement à l'état frais après la récolte dans le but d'une insémination immédiate, ou être conservée sous forme réfrigérée ou congelée pour une insémination ultérieure. La conservation particulièrement à l'état congelé, provoque des dommages aux spermatozoïdes qui concernent à la fois leurs structures (membranes, flagelles) et leur état fonctionnel. Ce qui influence leur motilité et leur viabilité. Malgré de nombreux travaux consacrés à ces problèmes, la fertilité de la semence congelée demeure généralement plus faible que celle de la semence conservée pendant quelques heures à température positive.

III.1. Conservation à court terme

III.1.1. Semence fraîche

Pour les étalons ayant de bonne fertilité, le sperme collecté est utilisé immédiatement ou jusqu'à **6 heures** après sa récolte et ce n'est pas nécessaire de le refroidir, et dans la plupart des cas il est dilué avec un agent de préchauffage à des rapports des **1 : 1 à 1 : 3 (sperme-dilueur)** en fonction de la concentration en sperme brut et de volume éjaculé, sitôt après sa dilution le sperme doit être retiré de l'incubateur et peut-être refroidi à température ambiante (**15-20 °C**) (Angus O. et al, 2011).

L'utilisation de cette semence conservée à la température ambiante semble présenter un intérêt particulier dans le cas des étalons dont la qualité du sperme est médiocre après le refroidissement, tandis que, certains auteurs disent que la conservation de la semence fraîche entre **15–20 °C** maintient le métabolisme des spermatozoïdes mais les rend plus sensibles aux éléments toxiques métabolisables (**G. Decuadro-Hansen., 2004**).

Le lait **UHT** ou les dilueurs à base de lait sont les plus utilisés pour la conservation de sperme d'étalon en vue de l'IA immédiate ou différée, alors que ces milieux de dilution doivent être ajoutés sitôt après la récolte de sperme (**G. Decuadro-Hansen., 2004**).

III.1.2. Semence refroidie

Dans l'espèce équine, la réfrigération de la semence à peut constituer soit un processus à part entier, soit une des étapes du processus de cryoconservation qui correspond au refroidissement de la semence avant la congélation proprement dite, c'est-à-dire à l'étape d'équilibration.

La réfrigération peut être indiquée dans le cas d'une insémination à distance lorsque les animaux sont éloignés géographiquement, lorsque la semence est de qualité médiocre ou encore lorsqu'il faut différer une insémination initialement prévue avec de la semence fraîche (**Marc Stéphanie., 2015**).

En pratique, en accord avec la littérature, la semence équine réfrigérée est le plus souvent conservée à **4°C**, en anaérobiose, pendant **24 heures** (aux USA), bien que la majorité des doses soient utilisées dans les **12 heures** en France. Cependant, la semence peut parfois être conservée plus longtemps : un taux de gestation de 75% après conservation avec des dilueurs à base de lait pendant 40-48 heures, de **77%** au bout de **70 heures** et de **57%** au bout de **80 heures** (**Heiskanen et al., 1994a et b**). **Batellier et al. (2001)** obtiennent une fertilité de **48%** au bout de **72H**, dans de l'**INRA 96**.

La conservation de la semence fraîche à **4°C** réduit le métabolisme des spermatozoïdes ce qui permet une économie de leur réserve énergétique et une bonne conservation de leur mobilité qui est restaurée après réchauffement (**G. Decuadro-Hansen., 2004**).

Dans l'espèce équine, les dilueurs de réfrigération adaptée à la réfrigération de la semence sont, en règle générale, à base de lait, comme par exemple le milieu **INRA96**. Avant utilisation, il convient d'ajouter au dilueur du jaune d'œuf frais dans la proportion de **20 %** de jaune d'œuf pour **80 %** de dilueur.

III.1.3. Conservation à long terme (La Cryoconservation)

A. Définition

La cryoconservation correspond à la préparation de cellules ou de tissus en vue de leur stockage à une température inférieure à **-80°C**. Cette procédure permet la conservation de ces cellules ou tissus pendant de nombreuses années et leur utilisation après réchauffement à la température ambiante. Les spermatozoïdes de mammifères furent les premières cellules à être congelées avec succès dans les années cinquante par Polge, **Smith et Parkes** et, depuis, la cryoconservation de la semence n'a cessé de se développer, notamment en ce qui concerne la reproduction dans les filières d'élevage (**Day et Stacey, 2007**).

Il s'agit d'une biotechnologie importante permettant la conservation des espèces menacées ou, incapable de se reproduire. D'éviter la propagation de certaines maladies sexuellement transmissibles, d'éliminer les barrières géographiques et de préserver le matériel génétique d'un animal pendant une période de temps théoriquement illimitée (**Neto et al. 2014 ; Day et Stacey 2007**).

B. Principe

La cryoconservation du sperme implique le stockage du sperme à des températures inférieures à zéro (**c'est-à-dire congelées**), car il n'est pas possible de garder les spermatozoïdes à la température du corps vue de la mortalité cellulaire importante qui s'ensuit à cause d'une activité métabolique intense (**Varner et al. 1988**).

Le cryogène généralement utilisé pour cette tâche est l'azote liquide (**- 196 ° C**). Si les spermatozoïdes résistent aux processus de congélation et de décongélation, leur intégrité peut être maintenue presque indéfiniment dans l'azote liquide, car l'activité métabolique des spermatozoïdes est considérée comme négligeable à cette température. Si les spermatozoïdes d'un étalon donné réagissent favorablement au cycle gel-dégel, ils peuvent éventuellement conserver leur fonction pendant des siècles lorsqu'ils sont maintenus à **- 196 ° C**.

En l'absence d'agents cryoprotecteurs, la glace extracellulaire formée pendant la congélation entraînera une augmentation de la pression osmotique dans le milieu non gelé, ce qui extraira davantage d'eau de la cellule. La concentration de sels va donc augmenter à la fois au niveau intra et extracellulaire lorsque l'eau gèle, et la température doit diminuer pour protéger les protéines du relargage. Ainsi, des taux de congélation trop rapides entraînent des dommages structurels dus à la formation de glace intracellulaire, et des taux de congélation trop lents entraînent des dommages dus au sel des protéines.

À des températures inférieures à **260 ° C**, les cellules sont déshydratées et peuvent être conservées indemnes pendant plus de **1 000 ans**. La décongélation du sperme doit généralement être effectuée à une vitesse très rapide afin de réduire les risques de dommages dus à la croissance de cristaux de glace extracellulaire (**Bo G. Crabo., 2001**).

Il devient, donc, indispensable de maîtriser les modifications biologiques, physiologiques et physiques s'exerçant sur les cellules et leur environnement au moment de la cryoconservation afin d'apporter aux spermatozoïdes des composants pouvant leur permettre de résister à ces modifications délétères (**Mazur, 1968**).

III.2. La cryoconservation dans l'espèce équine

Grace à la cryoconservation, un intérêt plus vif est apporté à la reproduction des chevaux de course, ce qui a permis de diffuser la génétique de nos meilleurs étalons et d'importer celle des champions, garantir une assurance contre la perte imprévue d'un étalon et permettre l'accès au sperme congelé si le sperme frais ou refroidi n'est pas disponible avec la possibilité d'expédier le sperme dans le monde entier (**John Dascanio. 2014**).

Ce n'est qu'en 2001 que les deux plus grandes associations de race du monde, l'American Quarter Horse et l'American Paint Horse, ont autorisé l'insémination des juments avec de la semence congelée, stimulant un intérêt nouveau pour la technologie de cryoconservation de la semence d'étalon.

Alors que, malgré une bonne qualité de sperme frais et les différents milieux et techniques de réfrigération et congélation testés, certains éjaculats équins d'un nombre important d'étalons possédant de bonnes performances sportives s'avèrent subfertiles, c'est-à-dire que leur semence ne supporte pas la congélation, avec une qualité du sperme après décongélation insuffisante pour des raisons encore inconnues. C'est pourquoi les méthodes de

sélection des spermatozoïdes d'étalon représentent un outil de grande valeur dans les techniques de reproduction assistée de l'espèce équine.

III.3. Les agents cryoprotecteurs :

L'ajout de l'agent cryoprotecteurs, tel que le glycérol, a pour but d'améliorer la survie des cellules en augmentant la concentration totale en solutés dans le milieu extérieur ce qui diminue la quantité de glace formée quelle que soit la température. Dans un premier temps, l'ajout de l'agent cryoprotecteur expose la cellule à un environnement hypertonique ce qui entraîne initialement une déshydratation cellulaire. Suite à la pénétration de l'agent cryoprotecteur à l'intérieur de la cellule lors de l'étape d'équilibration, la cellule retrouve sa taille normale. Lors du retrait de l'agent cryoprotecteur, le volume cellulaire varie encore une fois et cela peut s'avérer néfaste pour la survie du spermatozoïde. Ainsi l'ajout et le retrait de l'agent cryoprotecteur ainsi que la congélation induisent un stress osmotique et sont à l'origine de variations du volume de la cellule spermatique (gonflement ou déshydratation).

- **Les cryoprotecteurs non pénétrants**

Ils agissent uniquement dans le milieu extracellulaire. Ils agissent comme solutés en diminuant la température de congélation du milieu et en prévenant la formation de glace, et possèdent également la propriété de protéger les membranes des spermatozoïdes.

- **Le lait :** constitue le composant de base de nombreux dilueurs. Il permet un apport en phosphates, citrates et sucres aux spermatozoïdes, possède un pH **proche** de celui du sperme et reste facile à préparer et peu cher.
- **Le jaune d'œuf :** est l'un des composants les plus employés dans les dilueurs. Puisqu'il a été démontré que sa présence protégeait contre le choc par le froid, il assure la protection des membranes des spermatozoïdes lors de la congélation grâce aux phospholipides qu'il contient. Chez le cheval, des essais utilisant le plasma de jaune d'œuf qui contient les LDL ont montré de bons résultats en termes de fertilité alors que la mobilité après décongélation n'était pas augmentée, illustrant bien les limites de l'évaluation de la mobilité comme critère de fertilité (**Pillet et al. 2011, 2012**).

- **Les cryoprotecteurs pénétrants**

Comme le glycérol, le diméthylsulfoxyde (**DMSO**) (**Gilmore et al, 2000**) ou les amides (**Alvarenga et al, 2005**) : ils sont de bas poids moléculaire ; en entrant dans la cellule, ils limitent la formation de cristaux intracellulaires (mais également extracellulaire). De même, ils entraînent des réarrangements lipidiques et protéiques de la membrane cellulaire ce qui induit une augmentation de la fluidité membranaire, une modulation du niveau de déshydratation cellulaire et une meilleure survie à la cryoconservation.

- **Le glycérol** : est resté le principal agent protecteur cryogénique pour la congélation du sperme, Son mode d'action reste obscur, même s'il est connu qu'il modifiera la formation de cristaux de glace pendant la congélation et la décongélation. On peut aussi supposer qu'il remplace l'eau dans les macromolécules congelées pour empêcher le repliement et la dénaturation. (**Bo G. Crabo., 2001**).

Pour les spermatozoïdes d'étalon, plus sensibles aux variations osmotiques, la concentration en glycérol ne devrait idéalement pas dépasser les 3,5 % du volume total. Récemment, un milieu de congélation ne contenant que 2,5 % de glycérol a été développé et de très bons résultats de fertilité ont été observés (**Barbas et Mascarenhas 2009 ; Ponthier et al. 2014**).

III.4. Dilution du sperme

Les chercheurs s'intéressant à la conservation de la semence ont très vite remarqué la nécessité de diluer la semence dès sa récolte, sans quoi sa durée de vie ne dépasse pas une heure ou deux (**Katila, 1997**) et son pouvoir fécondant est en grande diminution. Ceci est dû à deux phénomènes d'importance égale :

- La compétition entre spermatozoïdes pour les éléments nutritifs ou une accumulation de métabolites nocifs lorsque la concentration en gamètes est trop élevée.
- Les effets délétères du plasma séminal.

La dilution permet d'obtenir une concentration en spermatozoïdes optimale pour la congélation. La concentration finale en spermatozoïdes dans l'échantillon dépend du choix du taux de dilution. Un nombre de spermatozoïdes d'au moins 200 millions par dose d'insémination artificielle doit être obtenue, avec un volume maximum de 1/3 de sperme pur

pour 2/3 de dilueur (**Isabelle Barrier-Battut, 2013**).

Plusieurs méthodes peuvent être utilisées pour la dilution de la semence à savoir, l'utilisation d'un vagin ouvert pour ne récolter que la fraction riche de l'éjaculat ou encore la centrifugation de la semence. Alors que la méthode la plus couramment usitée, consiste à diluer de façon importante l'éjaculat entier (**5 à 20% selon Katila., 1997**). Certains étalons – à concentration faible en spermatozoïdes ou ne possédant pas assez de spermatozoïdes ayant une mobilité progressive (= PMS pour Progressive Motile Sperme) – ne peuvent néanmoins pas profiter de ces solutions, car elles engendreraient des doses d'insémination de trop grand volume avec une concentration en spermatozoïdes trop faible.

III.5. Les dilueurs

Un dilueur est nécessaire pour assurer une protection aux spermatozoïdes, entre autres par un effet de volume. Il existe un grand nombre de dilueurs, à base de lait ou de solution saline, ayant tous pour objectif une meilleure survie des spermatozoïdes.

- **Composition**

En règle générale, les dilueurs contiennent des agents cryoprotecteurs pénétrants ou non pénétrants dont le rôle est d'augmenter la survie des spermatozoïdes. On retrouve également d'autres composés dans les dilueurs comme par exemple des antibiotiques, des substances nutritives telles que des sucres, des sels ou encore des détergents (**Barbas et Mascarenhas 2009 ; Ponthier et al. 2014 ; et al. 2011**).

Le dilueur doit posséder plusieurs propriétés afin d'améliorer la survie des spermatozoïdes. Il doit être isotonique à la semence afin d'éviter les chocs osmotiques, avoir un pH compatible à la survie des spermatozoïdes, posséder un pouvoir tampon, une osmolarité appropriée (c'est-à-dire **300 mOsm/L avec un pH de 7,4 à 7,6**), pour la plupart des dilueurs, l'osmolarité se situe entre **280 et 450 mOsm/L avec un pH de 6,6 à 7,0 (Katila, 1997)**. Il doit aussi avoir une action stabilisatrice et protectrice des membranes, un pouvoir antioxydant et antibactérien. Il doit également être facile à préparer, à conserver et à utiliser (**Barbas et Mascarenhas 2009 ; Hanzen 2014**).

Les fractions les plus protectrices isolées partir du lait, telle que, le **phosphocaséinate natif (PPCN)** et la **β -lactoglobuline** se sont révélés être les plus performants pour la

conservation de la semence équine réfrigérée (Batellier et al, 1998 ; Batellier et al, 2001), d'où la création de l'INRA96. Dont la formulation de ce dilueur a été établie non seulement sur la base des résultats de mobilité, mais aussi sur ceux de fertilité de la semence conservée.

Les principaux dilueurs à l'heure actuelle sont (tableaux) :

Le lait UHT, le Kenney aussi appelé EZ-Mixin (CST Colorado) ou Non-Fat Dried Milk Solids Glucose (NFDMSG) ou encore Skim Milk Glucose extender (SKMG), le KMT, surtout utilisé pour remettre en suspension le sperme centrifugé car une interaction néfaste avec le plasma séminal a été mise en évidence (Rigby et al, 2001), l'INRA96.

Tableau 05 : composition de kenney et de l'INRA96 (pour 1l) (Marc Stéphanie., 2015).

Dilueur	Composition
Le Kenney	Glucose (49g), Lait en poudre (24g), Eau distillée stérile (q.s.p. 1 l), Streptomycine (1,5g), Pénicilline (1,5 millions UI)
L'INRA96 (IMV, L'Aigle, France)	CaCl (20,14g), KCl (0,4g), KH ₂ PO (40,06g), MgSO ₄ 7H ₂ O (0,2g), NaCl (1,25g), Na ₂ HPO ₄ 12H ₂ O (0,118g), NaHCO ₃ (0,35g), HEPES (4,76g), Glucose (13,21g), Lactose (45,39g), Pénicilline (50 000 UI), Eau distillée stérile (q.s.p. 1 l), Gentamycine (50 mg) Puis, Phosphocasinat (27g/l)

III.6. Les différentes étapes de la cryoconservation

III.6.1. Récolte et évaluation de la semence

Il existe de nombreuses techniques de récolte de la semence, rappelons que la technique la plus utilisée dans l'espèce équine est celle du vagin artificiel. Après la récolte, le sperme est filtré immédiatement pour extraire la fraction gel du sperme, une sécrétion filamenteuse des glandes annexes. Le sperme est ensuite analysé afin de déterminer ses caractéristiques (concentration en spermatozoïdes, mobilité...).

Pour que la semence soit considérée de bonne qualité afin d'être congelée, les Haras Nationaux recommandent un nombre total de spermatozoïdes progressifs par dose supérieur à 140 millions spermatozoïdes après décongélation, sachant qu'un éjaculat équin contient en

moyenne 10 milliards de spermatozoïdes (**Ponthier et al. 2014**). Selon le collège brésilien de reproduction animale - CBRA, **2013**, seuls les éjaculats avec plus de 60% de motilité totale ont été utilisés pour le refroidissement.

Le sperme est dilué une première fois avec le premier milieu à base de lait ou de composants de lait et ne contenant pas d'agent cryoprotecteur dont le volume de la fraction sans gel du sperme obtenue après éjaculation est mélangé avec un volume égal de dilueur. Différentes formulations commerciales existent et servent à conserver le sperme frais dans une gamme de température allant de **5 à 20°C**.

III.6.2. Séparation des différentes phases du sperme par centrifugation

En plus des spermatozoïdes normaux et viables, la semence peut contenir des spermatozoïdes morts ou anormaux, des contaminants (urine, bactéries, virus) et d'autres cellules (érythrocytes, cellules épithéliales, cellules germinales immatures) qui ont un effet toxique sur les spermatozoïdes vivants et réduisent par conséquent la fertilité d'un éjaculat. De plus, chez le cheval, le sperme est relativement peu concentré, contrairement à ce qui est observé dans d'autres espèces comme le bovin (**Baracaldo, 2007**). C'est pourquoi des techniques de séparation du sperme sont utilisées.

La technique de séparation utilisée en routine est la centrifugation. Par ailleurs, elle permette d'augmenter la concentration en spermatozoïdes de l'éjaculat, en enlevant le plasma séminal entièrement (**Vidament et al, 2000 ; 2001**), car il ne semble pas bénéfique pour la congélation du sperme équin (**Moore et al, 2005**), soit en gardant une petite fraction de celui-ci, de l'ordre de **5 %** du volume final après centrifugation (**Salazar et al, 2008 ; Ponthier et al, 2013**), pour la congélation.

La semence est diluée avec un dilueur primaire à 37°C, Les tubes sont centrifugés, idéalement à **600xg pendant 10 minutes** (**Barrier-Battut 2013 ; Neto et al. 2013**). Ensuite, le surnageant est enlevé, et les spermatozoïdes du culot sont alors remis en suspension dans une quantité appropriée de dilueur (**Barrier-Battut 2013**). L'ajout des milieux coussin à base d'une solution d'iodixanol, au fond des tubes a permis d'augmenter jusqu'à plus de **90 %** le pourcentage de récupération des spermatozoïdes après centrifugation (**Waite et al, 2008 ; Hoogewijs et al, 2010**).

Ainsi, la centrifugation sur des milieux colloïdaux permet de séparer les spermatozoïdes anormaux, les débris cellulaires et d'ainsi améliorer la qualité du sperme après décongélation en ne sélectionnant que les spermatozoïdes normaux qui sont considérés comme mobiles et potentiellement fertiles (Glander et al, 1990 ; Kobayashiet al, 1991 ; Loomis, 2006 ; Morrell, 2006 ; Edmond et al, 2008 ; Hoogewijs et al, 2010 ; Ponthier et al, 2013). Cette méthode est très utile chez les étalons dont la qualité du sperme frais est faible, mais elle nécessite du temps et entraîne de grandes pertes en spermatozoïdes et donc une diminution de la production de paillettes par éjaculats.

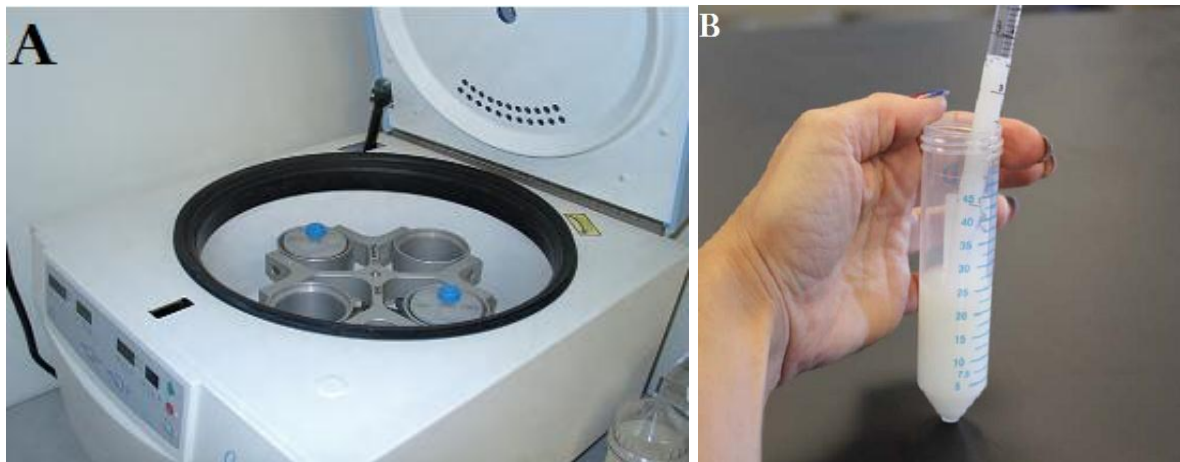


Figure 18 : centrifugation de sperme dilué (A), puis aspiration de surnageant après centrifugation (B) (Steven P. et al. 2011)

III.6.3. La dilution

Une fois que le culot riche en spermatozoïdes est obtenu, il est dilué avec le milieu de congélation contenant un agent cryoprotecteur, Le volume de milieu de congélation nécessaire pour atteindre la concentration finale désirée dans les paillettes est ajouté (Vidament, 2005).

La concentration finale après congélation dépend de la dilution avec le milieu de congélation et donc des options de commercialisation choisies lors de la production, mais aussi de la contrainte technique imposée par le milieu de congélation. En effet, si les dilueurs utilisés contiennent de basses concentrations en agent cryoprotecteur, il faudra minimiser le rapport entre le volume du milieu de congélation et le volume du culot cellulaire afin que la concentration en agent cryoprotecteur ne soit pas trop basse dans la dilution finale. Il est

conseillé d'inséminer avec des doses finales contenant au moins 400 **millions** spermatozoïdes (**Ponthier et al. 2014**).

III.6.4. L'équilibration (la réfrigération)

Le premier palier de la descente en température consiste à équilibrer la température du sperme à 4°C pendant **75** minutes (**Ponthier et al. 2014**). Cette étape d'équilibration fait suite à la centrifugation et à la dilution et correspond à la réfrigération préalable de la semence avant la congélation proprement dite. Elle permet au glycérol de pénétrer dans la cellule et serait à l'origine d'une meilleure survie des spermatozoïdes après décongélation en leur évitant un refroidissement trop brutal (**Marc Stéphanie, 2015**).

III.6.5. Le conditionnement

La semence est conditionnée juste avant d'être congelée, dans le but de fractionner la semence de façon à ce qu'elle soit facilement identifiable, stockable et utilisable. Deux principaux supports sont disponibles pour la congélation : les pastilles et les paillettes. Les ampoules qui sont à l'origine prévues pour une congélation lente sont peu souvent utilisées. Alors que les paillettes ou « **straws** » étant les plus couramment utilisées de nos jours. (**Marc Stéphanie, 2015**).

Les paillettes sont de fins tubes en chlorure de polyvinyle, obstrués à une de leurs extrémités par une pièce de coton. L'autre bout est libre et servira au remplissage de la paillette dont la contenance généralement chez l'étalon est de 0,5 millilitre contenant un totale de 100 ou 200 millions de spermatozoïdes par paillette. Une dose typique serait constituée de huit ou quatre paillettes avec un totale de 800 millions de spermatozoïdes (**John Dascanio. 2014**).

Une fois remplies, les paillettes qui sont identifiées (nom du mâle prélevé, de son numéro d'identification, de la date de récolte, de dilueur et de sa concentration et de l'identification du centre d'insémination) sont bouchées au moyen de poudre d'alcool polyvinylique et une légère agitation permettra de ménager une place pour l'obturation et la bulle d'air nécessaire pour permettre la dilution du sperme lors de la congélation (**Loomis 2006 ; Hanzen 2014 ; Dumon 2007**).

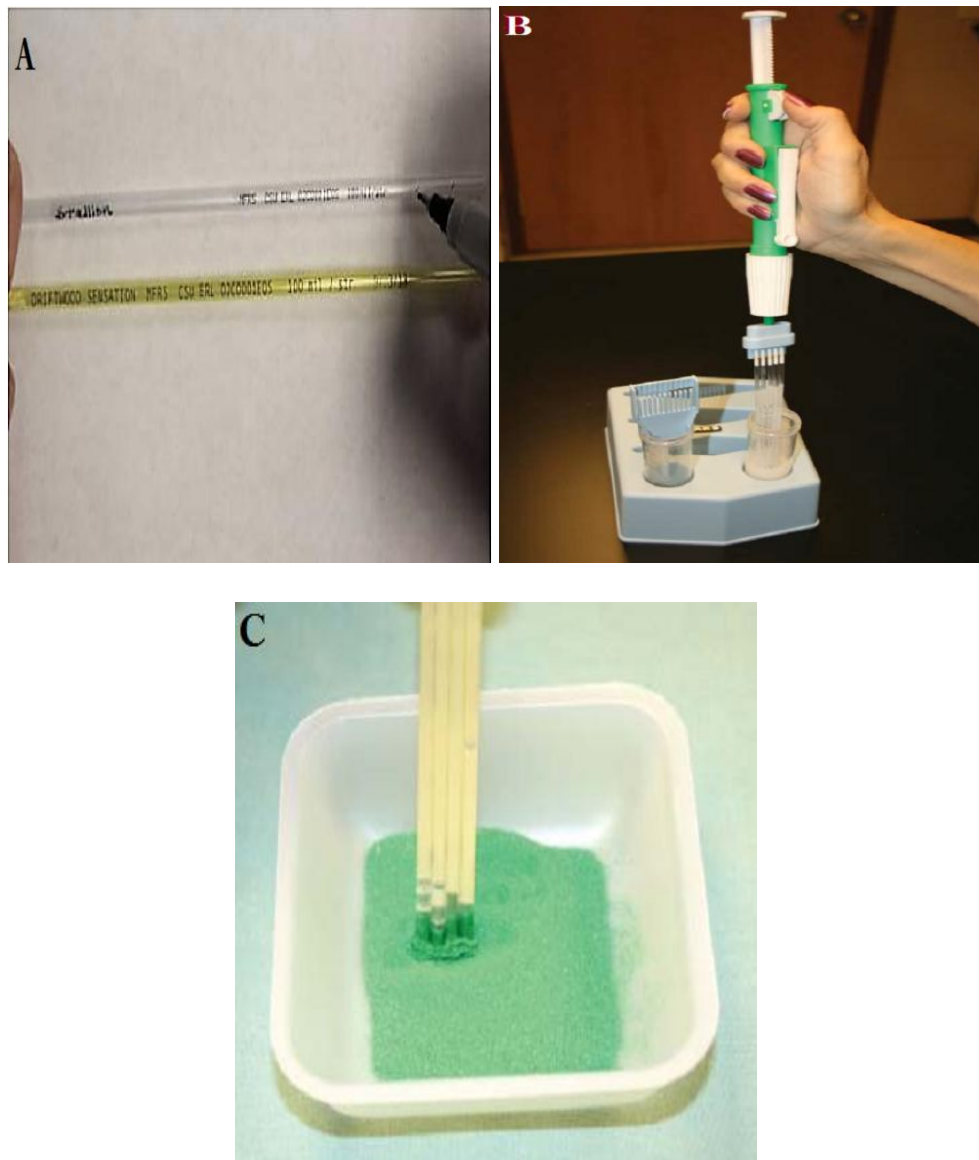


Figure 19 : identification (A), remplissage (B) et bouchage (C) des paillettes (John Dascanio, 2014).

III.6.6. La congélation

Après l'étape d'équilibration, les paillettes peuvent être refroidies dans un congélateur programmable qui permet d'atteindre -140°C , avec une pente variable, selon le milieu de congélation utilisé, entre -20°C et -60°C par minute. Et elles sont ensuite immergées dans l'azote liquide à -196°C (Ponthier et al. 2014). Comme elles peuvent être congelées dans une boîte de polystyrène contenant de l'azote liquide : Les paillettes chargées sont placées dans une grille pré-refroidie (à 5°C) de telle sorte qu'elles se trouvent de **3 à 6 cm** au-dessus de

l'azote liquide pendant **10 minutes** d'équilibrage, ou jusqu'à ce que la température atteigne **-120°C**, elles sont ensuite plongées dans l'azote liquide, placées dans des gobelets qui sont déjà fixés sur des cannes et finalement stockées dans un réservoir d'azote liquide à **-196°C** pendant des mois, voire des années. (John Dascanio. 2014).

Le choix de la vitesse de congélation est essentiel car il détermine la façon dont le spermatozoïde parviendra à rester en équilibre avec le milieu extracellulaire. La vitesse de congélation optimale est une vitesse initialement lente afin de permettre une déshydratation suffisante de la cellule pour prévenir la formation de cristaux de glace intracellulaires, puis rapide pour éviter une déshydratation trop importante de la cellule (Marc Stéphanie, 2015).

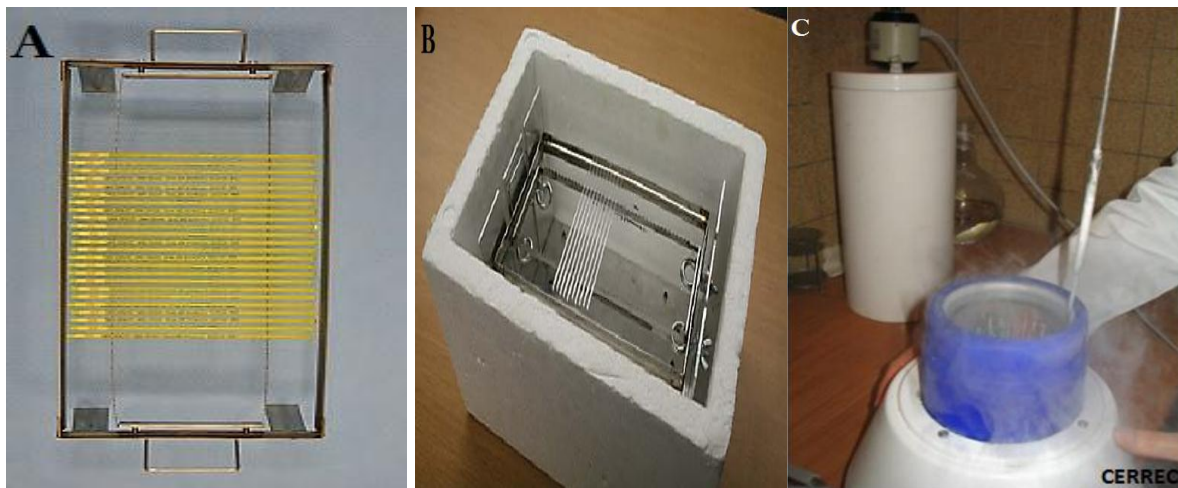


Figure 20 : paillettes déposées sur une grille (A) ensuite placées dans une boîte de congélation en polystyrène au-dessus de l'azote liquide (B) puis stockées dans une cuve d'azote liquide(D) (John Dascanio. 2014 ; Steven P. et al. 2011)

III.6.7. La décongélation

La semence est décongelée juste avant son utilisation, lors d'une insémination artificielle le plus souvent dont les paillettes sont directement transférées de l'azote liquide dans un bain-marie, et la méthode de décongélation recommandée est dictée en particulier selon le diamètre de la paillette à décongelée.

Dans la plupart des cas les paillettes de **0,5 ml** sont décongelées à **37°C** pendant **30 secondes**, alors que certains chercheurs ont suggéré que la décongélation de ces paillettes à **75°C** pendant **7 secondes** pouvait générer une mobilité accrue des spermatozoïdes après

décongélation tandis que pour d'autres chercheurs une température de **46°C** pendant **20 minutes**, peut-être recommandée, Bien que cela puisse être le cas (**Steven P. et al. 2011**).

III.6.8. Evaluation de la qualité de la semence congelée

Après la décongélation, et avant toute utilisation de la semence, il est recommandé d'effectuer un contrôle de qualité sur chaque éjaculat pour essayer de prédire le pouvoir fécondant, et cela en prenant deux paillettes au hasard pour effectuer un spermogramme qui porte sur l'évaluation de pourcentage et de nombre des spermatozoïdes vivants et mobiles estimés en microscopie optique ou à l'aide du système CASA. Cependant, pour certains étalons la fertilité peu être diminuée après conservation, malgré un spermogramme satisfaisant voire excellent (**Marc Stéphanie, 2015**).

Jasko et al. (1992a et b) et Kenney et al. (1971) ont montré qu'il était relativement facile d'évaluer qualitativement le sperme d'un étalon à l'aide d'un spermogramme, mais qu'il était très difficile de prédire quantitativement sa fertilité. En effet, chacun des paramètres qualitatifs (mobilité, concentration, les anormaux, etc.) est plus ou moins corrélé à la fertilité d'un étalon.

En pratique ce contrôle n'est pas toujours réalisé car particulièrement chronophage mais un test de décongélation peut être réalisé sur une paillette de chaque éjaculat congelé par réalisation d'un test de mobilité (**Ponsart et al. 2014**). D'où il est généralement admis que le pourcentage de mobilité progressive après décongélation doit être d'au moins **30%** (**John Dascanio. 2014**).

➤ **Nouveaux contrôles de qualité :**

Les contrôles de qualité actuels reposent sur le postulat qu'un spermatozoïde progressif est de bonne qualité et que, par conséquent, il pourra féconder l'ovocyte. Cependant, une fois arrivé à l'ovocyte, le spermatozoïde va devoir utiliser d'autres organites pour accomplir d'autres fonctions : se fixer sur l'ovocyte, traverser la zone pellucide, fusionner et libérer une information génétique non altérée. Diverses structures du spermatozoïde ont été étudiées : on peut citer l'intégrité de l'acrosome (**Oliveira et al, 2010**), l'intégrité de l'ADN (**Baumber et al, 2003**), la fonction mitochondriale (**Ortega Ferrusola et al, 2009b**), l'intégrité

membranaire (**Oliveira et al, 2010**) et les indices morphométriques qui évaluent la forme géométrique du spermatozoïde (**Gravance et al, 1997**). Ces tests sont donc des moyens efficaces pour juger l'état de la semence après conservation, mais aucun n'est pour l'instant corrélé directement à la fertilité des étalons (**Yoann., 2008**).

Etude expérimentale

Partie expérimentale

L'objectif de cette étude expérimentale est de tester l'effet du miel d'abeille (miel d'euphorbe) supplémenté à des différentes concentration (**1%, 2%, 3%, 4% et 5%**), au milieu de congélation que nous avons utilisé, sur la qualité de la semence après décongélation. Où nous avons choisis d'évaluer deux critères qualitatifs : **la mobilité** et **la longévité** des spermatozoïdes en post-décongélation, qui sont le plus souvent en corrélation avec la fertilité d'étalons dans les semences congelées.

Matériel et méthodes

I. Lieu de l'expérimentation

Notre étude s'est déroulée au niveau du laboratoire de reproduction du parc équin de l'institut des sciences vétérinaires, à L'université Ibn Khaldoune de Tiaret.



Figure 21: Le laboratoire de la reproduction équine de l'institut des sciences vétérinaires

II. Effectif de l'expérimentation

L'expérimentation a été réalisée durant la saison de monte **2019** (saison administrative du **01 février au 30 Juin**) sur la semence de deux étalons d'éleveurs privés de race arabe-barbe. **ANBAR** : un cheval âgé de **11 ans** avec une robe grise-pommelée, et **REZKI** : un étalon âgé de **6ans** avec une robe grise-foncée. Les deux étalons étaient

maintenus dans des boxes individuels au niveau de l'institut et recevaient quotidiennement chacun d'eux, une ration composée de **6 kg** d'orge et **5 kg** de foin, avec de l'eau qui est distribuée à volonté. Leur fertilité était connue grâce aux résultats d'insémination en monte naturelle obtenus dans les années précédentes et aussi grâce aux résultats d'insémination artificielle en semence fraîche obtenus en **2019**.

III. Déroulement des récoltes

Les étalons étaient récoltés ou bien utisés en monte naturelle dans la semaine précédente pour vider leur réserve extra-gonadique de spermatozoïdes et ainsi avoir une qualité constante de la semence. Les deux étalons étaient récoltés au moins deux fois par semaine. Pour que la concentration en spermatozoïdes ne diminue pas, les collectes n'étaient pas réalisées deux jours consécutifs pour un même étalon. Ils étaient donc collectés un par un alternativement, mais seulement un seul éjaculat par étalon était utilisé pour la conservation.

III.1. La Préparation du vagin artificiel

La récolte du sperme a été faite à l'aide d'un vagin artificiel de type **Missouri**, immédiatement avant la récolte la chambre à eau du vagin artificiel est remplie avec de l'eau à **45-50°C**, et la pression à l'intérieur du vagin artificiel est ajustée d'une manière à ne pas gêner la pénétration ou la dilatation de la verge à l'intérieur du vagin artificiel, où elle doit être favorable à l'éjaculation, et ceci est en fonction des besoins de chaque étalon.

Avant le prélèvement, la surface interne du vagin artificiel est lubrifiée avec un lubrifiant stérile et non spermicide (vaseline naturelle) et le biberon de récupération du sperme avec un filtre à sperme est placé à la température corporelle qui a été maintenue constante pendant la durée du prélèvement et de l'acheminement de l'échantillon jusqu'au laboratoire, et ceci afin d'éviter d'éventuels chocs thermiques.

Le filtre à sperme placé à l'entrée du biberon de récupération du sperme était utilisé afin d'augmenter le nombre de spermatozoïdes récupérés dans chaque éjaculat en permettant de séparer la partie liquide de l'éjaculat, qui renferme les spermatozoïdes, de la partie épaisse et gélatineuse, le gel, qui correspond à la dernière fraction de l'éjaculat.



Figure 22 : Les étapes de préparation du vagin artificiel de type Missouri

III.2. La préparation d'étalon

Avant d'accéder à la récolte du sperme, l'étalon qui est maintenue dans son boxe individuel a eu tout d'abord le pénis lavé à l'eau tiède puis séché par des serviettes en papier jetable pour éliminer toute la saleté et les débris.

Le cheval est ensuite déplacé par un opérateur de son boxe vers la zone de récolte où il est stimulé dans un premier temps par la vue de la jument en œstrus, la monte demande un effort pour l'étalon, donc il lui faut une petite séance d'échauffement.

L'étalon à récolter est encore stimulé dans un second temps on le plaçant par l'opérateur en regard de la jument « **boute-en-train** » présentant un œstrus comportemental

qui est-elle même bien immobilisée par des entraves et placée à l'autre côté d'un fantôme de reproduction.



Figure 23 : L'excitation de l'étalon en présence de la jument « boute-en-train »

III.3. La récolte

La récolte est faite dans une zone de monte spéciale. Nous travaillons toujours en équipe, de trois ou quatre soigneurs, jamais seul, avec celui qui tien l'étalon et le collecteur du même côté du cheval (côté gauche de la jument). Une fois qu'il est monté, la verge du cheval est alors détournée par l'opérateur qui l'insère dans le vagin artificiel et le sperme est recueilli dans le biberon de récupération du sperme. Cela dure quelques secondes, le vagin est ensuite retiré soigneusement du pénis, il est mis en position verticale et vidé de l'eau chaude pour essayer de récupérer la totalité de l'éjaculat et évité un contact prolongé de l'éjaculat avec la paroi interne du vagin chaude, puis il est directement acheminé vers le laboratoire qui se trouve juste à côté de la zone de collecte. L'étalon est ensuite remis au box.



Figure 24 : Les étapes de la récolte de sperme

IV. Sélection des éjaculats pour la congélation

Dans notre expérimentation, seulement les éjaculats avec une concentration en spermatozoïdes qui est supérieur à 100×10^6 spermatozoïdes /mL et une mobilité individuelle égale ou supérieure à 75% ont été utilisées pour la cryoconservation.

V. Préparation du milieu de dilution

Le Kenney aussi appelé Skim Milk Glucose extender (**SKMG**), décrit par (**Yoann, 2008**) était utilisé comme une source d'énergie, de protection contre les chocs thermiques, et d'optimisation de la survie des spermatozoïdes depuis la récolte jusqu'au moment d'insémination, ainsi comme une base de dilution de sperme après la récolte et l'évaluation initiale du volume sans gel et de la concentration en spermatozoïdes.

V.1. Ingrédients

Tous les composants de milieu Kenny que nous avons utilisés sont disponibles dans tous les laboratoires de recherches et peuvent être facilement obtenus (**le glucose, lait en poudre entier, antibiotiques**). Ces composants sont rassemblés dans le tableau ci-dessous :

Tableau 06 : La composition du Kenney (pour 1l)

Glucose $C_6H_{12}O_6$	49g
Lait en poudre	24g
Eau distillée stérile	q.s.p. 1 L
Streptomycine	1,5g
Pénicilline	1,5 millions UI

* **q.s.p.** : quantité suffisante pour **1L**.

L'utilisation des antibiotiques (**streptomycine et pénicilline**) peut être facultative

Partie expérimentale

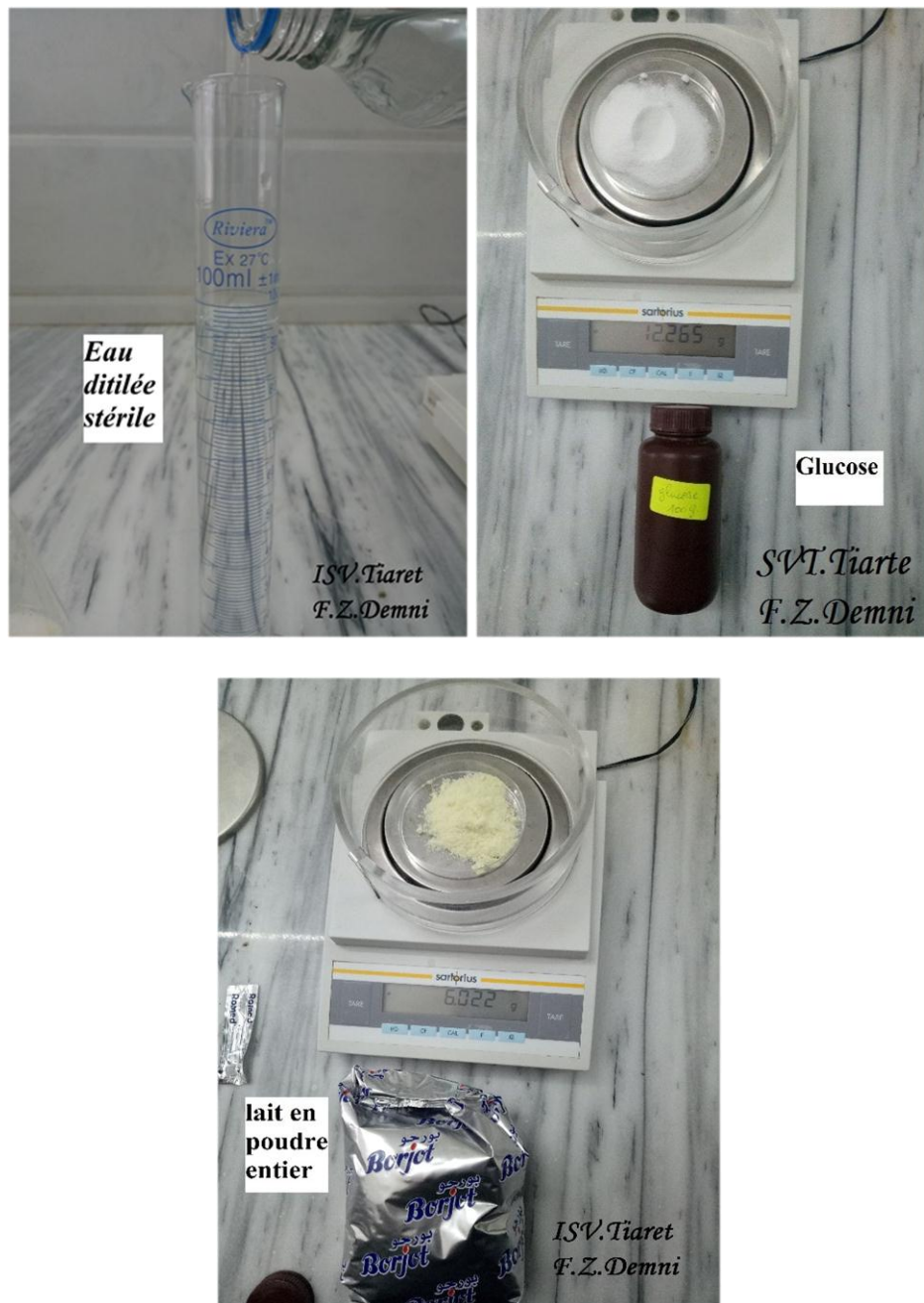


Figure 25 : Les ingrédients du milieu Kenney mesurés

V.2. Préparation

Dans notre expérimentation les quantités des ingrédients utilisées ont été mesurées dans une balance de précision (Sartorius®) seulement pour la préparation d'un volume de **250 mL** de dilueur et ceci a été fait quelques heures avant la récolte du sperme.

Partie expérimentale

Tous les ingrédients ont été mélangés dans un récipient en verre stérile puis versés dans un flacon en verre encore stérile, fermé et placé par la suite dans un agitateur magnétique (**HEITO Paris HM 32**) pour qu'ils soient remués pendant un certain temps jusqu'à mélange complet. Le diluant est ensuite mis dans une étuve réglée à **37°C** jusqu'au moment d'utilisation.

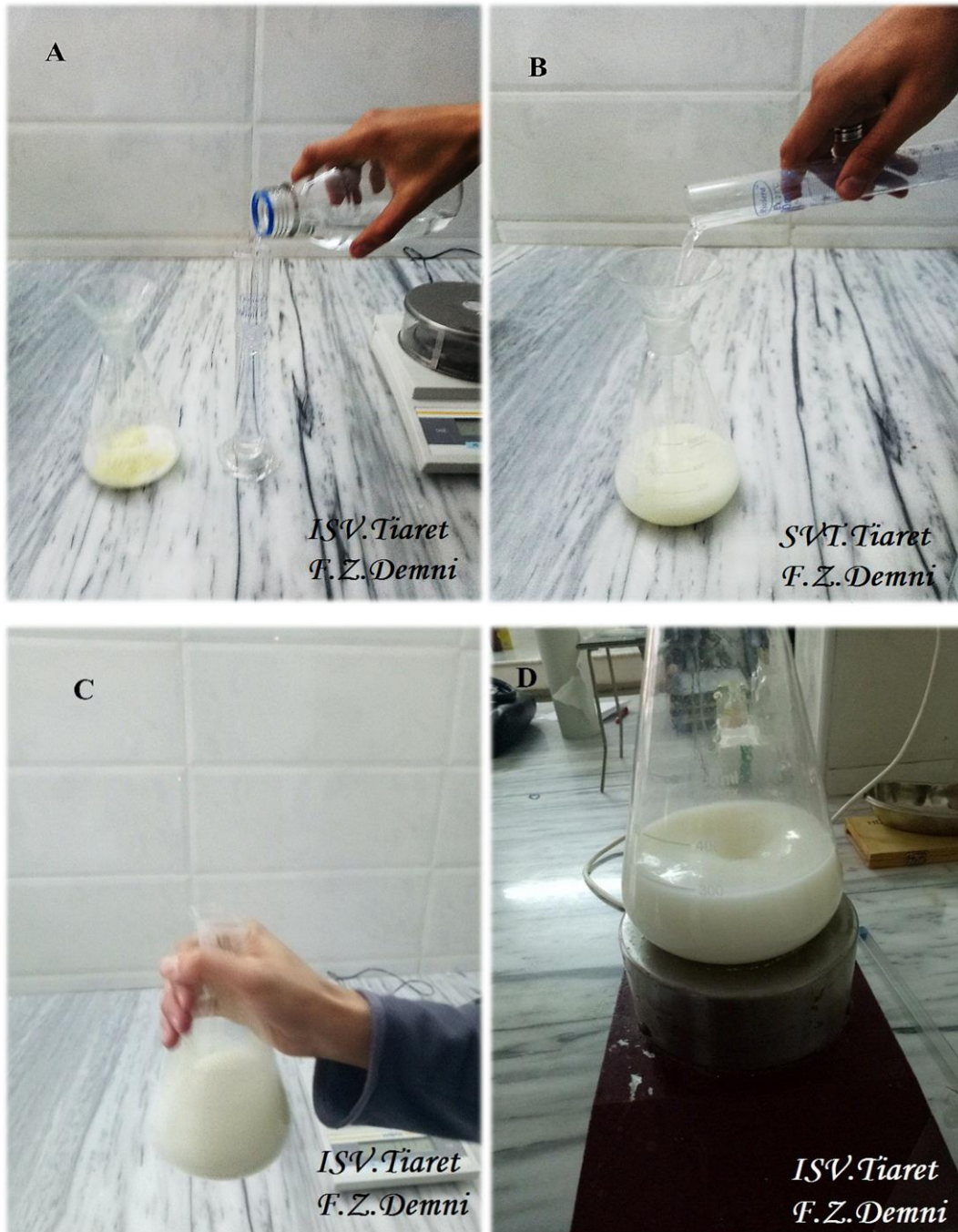


Figure 26: Les étapes de préparation du milieu Kenney

VI. Préparation du milieu de Cryo-congélation

VI.1. Le Kenney modifié

Tous d'abord, le milieu de dilution (**SKMG**) que nous avons préparé a été modifié en lui ajoutant **5%** de glycérol avec **15%** de plasma du jaune d'œuf. Le glycérol est pour améliorer l'aptitude à la fécondation des spermatozoïdes fragilisés ou endommagés pendant le processus de congélation, alors que le jaune d'œuf était ajouté dans le but d'améliorer la protection de la membrane plasmique des spermatozoïdes et ceci en fournissant un pouvoir tampon et des propriétés anti-oxydantes au dilueur de congélation (**John Dascanio, 2014**).

❖ Préparation de plasma du jaune d'œuf

Pour séparer le plasma de jaune d'œuf qui constitue la partie fluide du jaune d'œuf dans laquelle divers particules sont suspendues sur le reste de la fraction solide qui représente le jaune d'œuf lui-même, certaines étapes ont été suivies :

Tout d'abord, comme il est important de n'utiliser que du jaune d'œuf sans albumine ni parties riches en membrane, **2 à 3** jaunes d'œuf ont été doucement enroulés chacun sur une à deux feuilles d'un papier filtre, pour se débarrasser complètement de toute l'albumine, tout en gardant le jaune d'œuf intact.

La quantité du jaune d'œuf filtré était versé dans une éprouvette graduée stérile jusqu'à atteindre un volume de **21 mL**, ce volume obtenu était dilué par la suite en ajoutant **7 mL** d'eau distillée stérile pour diminuer la viscosité du jaune d'œuf. Le mélange ainsi obtenu était remplie dans un tube conique stérile de **45 ml** puis soumis à la centrifugation dans une centrifugeuse pendant **45 mn à 2000 x g (g : gravité)**, permettant d'avoir trois fraction le culot (membranes) la fraction moyenne (la partie à prélevée) et le surnageant (les lipides).

Un volume de **15 mL** du plasma de jaune d'œuf était aspiré à l'aide d'une seringue stérile et supplémenté à un volume de **80 mL** du milieu du dilution (**le Kenney**), un volume de **5 mL** de glycérol était en dernier lieu ajouté à ce mélange à cause de ces propriétés toxiques, rappelons que tous les constituants étaient mis préalablement à une température de **37°C**. Des aliquotes du dilueur Kenney modifié ont été complétées par différentes concentrations de miel d'abeille.



Figure 27 : La préparation de plasma du jaune d'œuf.

VI.2. Miel d'abeille (d'euphorbe) Kenney modifié (MEKM)

Une solution de miel a été préparée dans un tube à essai stérile, en ajoutant **1 mL** de miel à **9 mL** d'eau distillée stérile pour obtenir une solution de miel à **10%** de concentration. Cette solution est ajoutée à des aliquotes de Kenney modifié réparties sur **5 tubes** à essai encore stérile à des concentrations de : **0,5 / 4,5 (1% de miel enrichi en Kenny modifié (1% MEKM)), 1/4 (MEKM 2%), 1,5 / 3,5 (MEKM 3%), 2 / 3 (MEKM 4%), 2,5 / 2,5 (MEKM 5%) mL (v / v)** de miel / Kenney modifié, pour obtenir un volume final de **5 ml** dans chaque tube, et un aliquote sans miel pour représenter le lot témoin **5 ml** du Kenney modifié sans miel.



Figure 28 : Les solutions de miel préparées

VII. Evaluation des semences après la récolte

Une fois arrivé au laboratoire, le biberon de collecte était retiré du vagin artificiel et le filtre contenant le gel était immédiatement retiré du biberon afin d'éviter toute infiltration de gel dans la portion sans gel de l'échantillon de sperme récolté.



Figure 29 : Le vagin artificiel acheminé au laboratoire

Avant d'accéder à l'évaluation, tout le matériel entrant en contact avec la semence, ainsi que les milieux de dilution étaient préchauffés à la température corporelle, et la fraction sans gel récupérée a subi les tests suivants :

VII.1. Examen macroscopique

Une fois la semence au niveau du laboratoire le volume sans gel, la couleur et l'aspect sont estimés :

a. Volume

Le volume en mL a été évalué par lecture directe sur les graduations du tube de collecte. La mesure du volume était nécessaire pour calculer le nombre total de spermatozo

-ides contenus dans l'éjaculat

b. Couleur et aspect

La couleur et l'aspect des éjaculats étaient évalués à l'œil nue afin de détecter la présence éventuelle de sang, d'urine ou de pus dans l'éjaculat.



Figure 30 : L'aspect et couleur du sperme récolté

VII.2. Détermination de la concentration

La concentration en spermatozoïdes par **mL** de sperme était déterminée en utilisant un photomètre Minitube (**SDM1**) calibré sur la semence équine. Où un échantillon de sperme bien mélangé est chargé au niveau de l'extrémité de la microcuvette en utilisant une pipete jetable, la surface externe de la cuvette est bien nettoyée pour éliminer tout excès du sperme et la microcuvette est insérée par la suite au niveau de l'appareil, une fois le tiroir est fermé la lecture et le calcul de la concentration sont activés.



Figure 31 : La détermination de la concentration à l'aide d'un photomètre Minitube

VII.3. Examen microscopique

a. Mobilité massale

Immédiatement après évaluation macroscopique, le volume de la semence exempte de gel était analysé par le dépôt d'une goutte de sperme entre lame et lamelle propres, secs et chauffés à environ 37°C et placés par la suite sous le microscope optique (**OLYMPUS CX21**).

Dans un premier temps, le sperme est évalué au faible grossissement (**x10**) afin d'apprécier de façon subjective la mobilité massale, c'est-à-dire les mouvements de réunion et de dispersion de spermatozoïdes. Une note variant de zéro à cinq est attribuée par l'observateur (**Marc Stéphanies, 2015**).

b. Mobilité individuelle

une dilution au 25×10^6 SPZ/mL est nécessaire pour l'estimation de la mobilité individuelle, cela a été fait par l'ajout d'une goutte de sperme dans un épendorpe rempli de **1.5 mL** de dilueur.

Le sperme est examiné au fort grossissement (**x40**). Le taux des spermatozoïdes mobiles est calculé en examinant **100 spermatozoïdes** dans quatre champs microscopiques, celle-ci s'exprime en pourcentage (**note de 0 à 100%**), (Marc Stéphanies, 2015).

VIII. Traitement de la semence

Après que la semence des étalons soit examinée, l'étape suivante était sa dilution, son conditionnement dans des paillettes et sa congélation :

VIII.1. Dilution primaire

Pour garder les spermatozoïdes viables et mobiles et en bon état, une dilution **1 : 1** (sperme / dilueur) a été faite dans le dilueur de Kenney que nous avons préparé préalablement et qui avait été mis à l'étuve à **37°C**. Tout le matériel entrant au contact avec le sperme doit être à la même température.



Figure 32 : Le diluant Kenney et l'éjaculat misent à l'étuve réglés à 37°C.



Figure 33 : La dilution de sperme et le remplissage des tubes coniques à centrifuger

VIII.2. Centrifugation de la semence

Dans le but de séparer le plasma séminal des spermatozoïdes et de les concentrer, les échantillons de sperme qui ont subies une dilution primaire ont été remplies dans des tubes coniques de **45 mL** et centrifugés pendant **10 mn** à **600 x g** (Cochran JD et al, 1984).

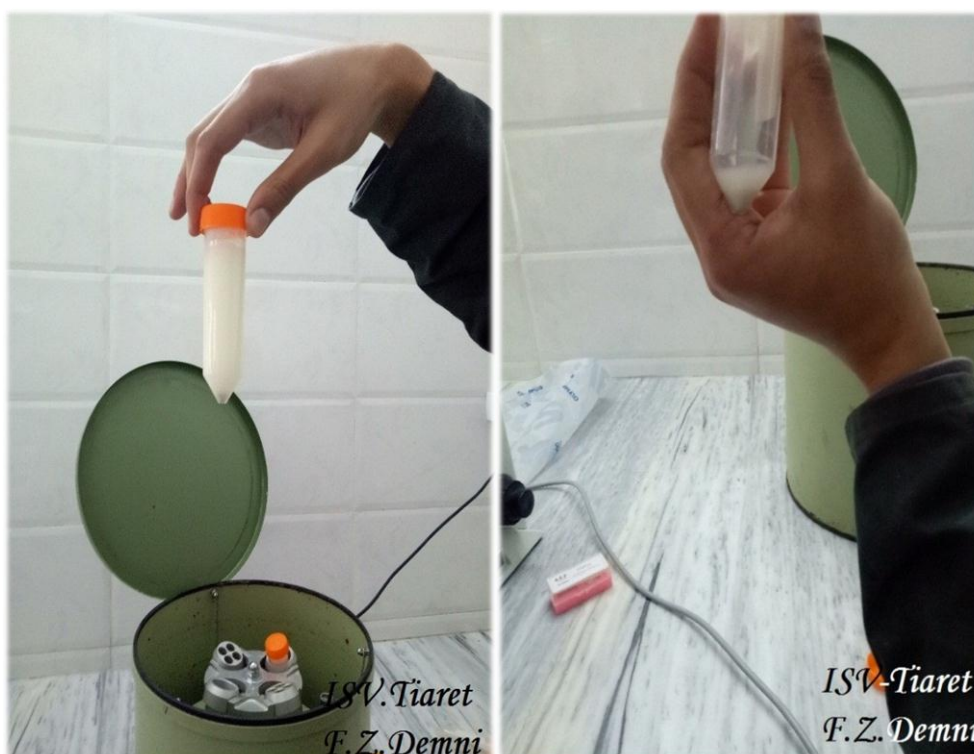


Figure 34 : L'aspect du sperme après centrifugation (à gauche), et du culot après l'aspiration de surnageant

VIII.3. Dilution secondaire

Après centrifugation, au moins **95%** du surnageant a été éliminé, les culots ont été ensuite rassemblés dans un seul tube et remis en suspension avec de Kenney modifié (contenant **15%** de jaune d'œuf et **5%** de glycérol). Le volume de Kenney modifié ajouté était calculé dans l'ordre d'atteindre dans un premier temps une concentration finale en spermatozoïdes de **$200 \times 10^6/\text{mL}$** :

$$[\text{CT}] \text{ en SPZ} = [\text{C}] / 1\text{mL en SPZ} \times \text{V}$$

$$\text{Volume de Kenney ajouté} = [\text{CT}] \text{ en SPZ} \times 0,5 / 200 \times 10^6 - (\text{volume des culots rassemblés})$$

[CT] : Concentration totale, **[C]** : Concentration, **SPZ** : spermatozoïde,

V : Volume de la fraction sans gel de l'éjaculat.

Partie expérimentale

Le volume des culots dilué était par la suite répartie dans des tubes à essais stériles sur des aliquotes de diluants Kenney modifié qui ont été complétées par différentes concentrations de miel d'abeille (**1%, 2%, 3%, 4%, 5%**) et sans miel (**0%, témoin**). Dans ce cas afin d'atteindre une concentration finale en spermatozoïdes de $100 \times 10^6 / \text{mL}$.

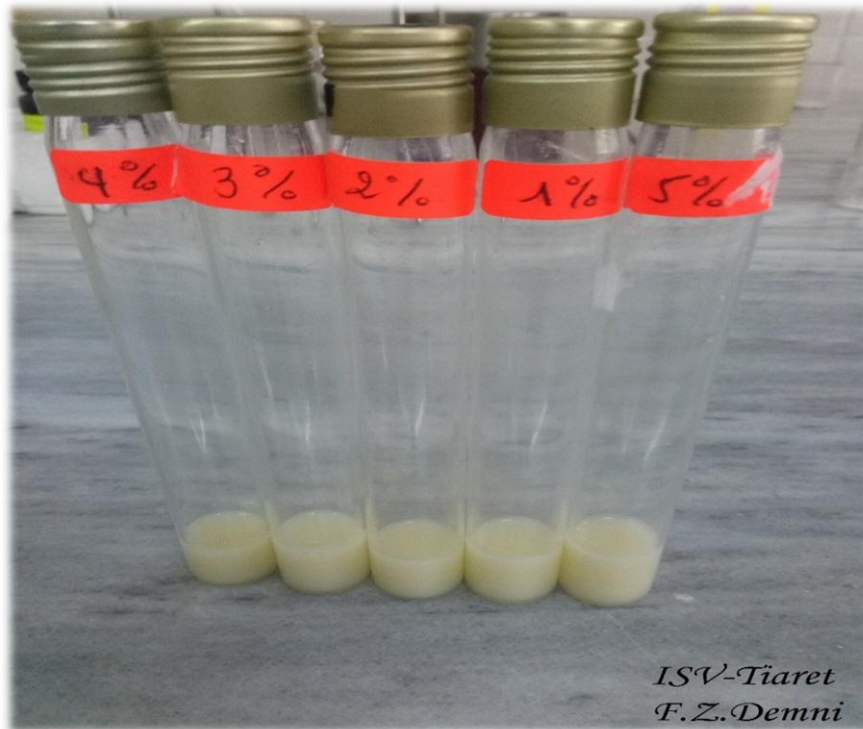


Figure 35 : Les aliquotes de Kenney modifié enrichie en miel à des différentes concentration.

VIII.4. Equilibration

Chaque aliquote a été par la suite refroidie lentement dans un réfrigérateur à **4°C** pendant **90 minutes**.

VIII.5 Conditionnement de la semence

Après équilibrage, la semence diluée est conditionnée dans des paillettes minitube contenant un volume de **0,5 mL**. Les paillettes sont tout d'abord identifiées à l'aide d'un marqueur indélébile en mentionnant le nom d'étalon, la concentration en miel, et la date de la récolte. Après le refroidissement de la semence diluée, celles-là sont remplies par aspiration buccale à travers l'extrémité bouchonnée de la paillette. A l'aide des pointes de micropipette,

un petit volume de la semence est retiré de la paillette de manière à laisser un vide d'environ **1cm**. Les paillettes sont obstruées par la poudre d'alcool polyvinyle et elles subies une légère agitation afin d'amener la bulle d'air au milieu de la paillette pour évité tous eclatement par le processus de dilatation.

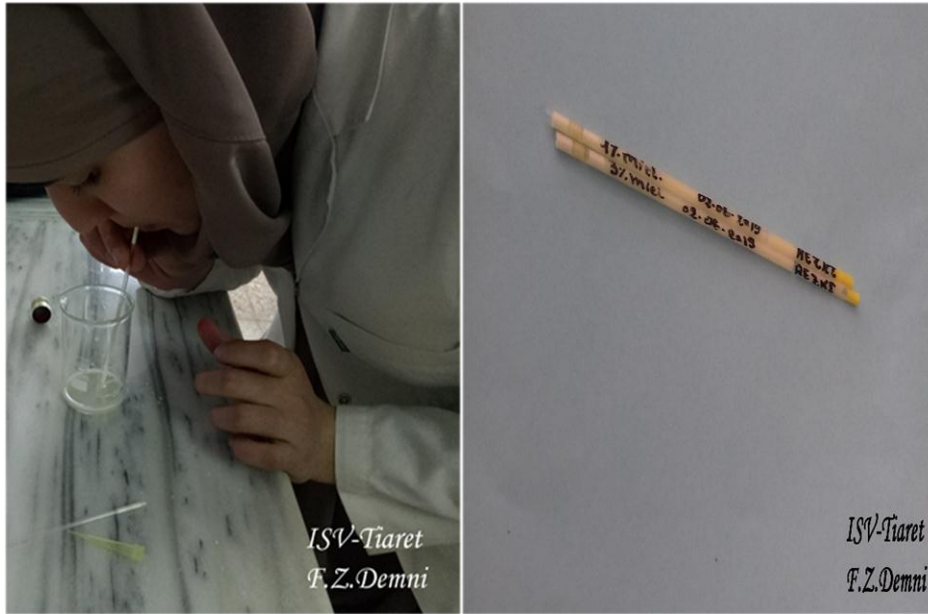


Figure 36 : Le conditionnement des paillettes

VIII.6. Congélation des paillettes

Les paillettes chargées en sperme ont été déposées sur une grille pré-refroidie (à **4°C**) puis placées en premier lieu à **4 cm** au-dessus de l'azote liquide en phase vapeur dans une boîte de polystyrène pendant **15 mn** avant d'être plongées en phase liquide (**Cristanelli MJ et al, 1985**). Les paillettes ont ensuite été stockées dans des fuseaux puis placées dans des canisters et maintenues immergées dans l'azote liquide jusqu'à décongélation.

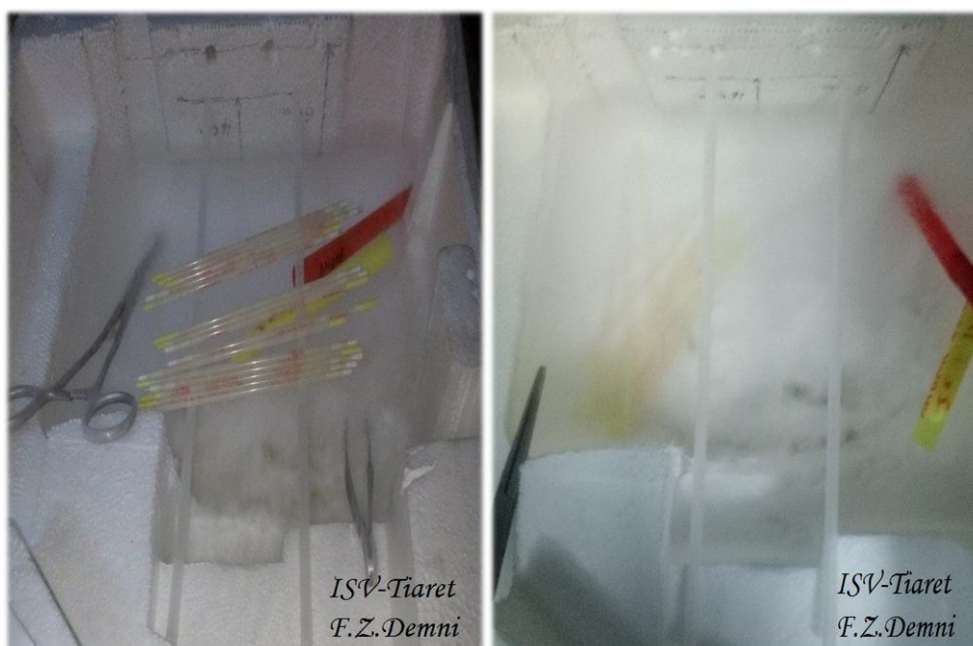


Figure 37 : Les paillettes placées au-dessus d'azote liquide en phase vapeur (à gauche), puis plongées en phase vapeur (à droite)

VIII.7. Evaluation des paillettes après décongélation

VIII.7.1. Décongélation

Pour décongeler, juste avant leur évaluation qui a été faite après **24 heures**, deux paillettes de chaque concentration sont directement transférées de l'azote liquide dans un bain-marie réglé à **37°C** pendant **30 secondes**, elles sont par la suite bien essuyées et leur contenu est vidé dans des tubes eppendorf qui sont mis à l'étuve à **37°C** en absence de la lumière.



Figure 38 : Les étapes de décongélation des paillettes

VIII.7.2. Evaluation

La motilité des spermatozoïdes a été examinée et enregistrée à l'aide d'un microscope optique juste à **0, 1/2, 1, et 2 heures** après décongélation des paillettes, une goutte de sperme est déposée entre lame et lamelle préchauffées à **37°C**, l'évaluation et le calcul de pourcentage de motilité ont été réalisés comme nous l'avons décrit précédemment, cela était fait pour chaque concentration.



Figure 39 : L'évaluation de la motilité des spermatozoides sous le microscope optique

IX. Test statistique

Des tests statistiques (à l'aide du programme SPSS version 22) ont été réalisés pour les données obtenues concernant les qualités de sperme congelé-décongelé. Des comparaisons multiples des moyennes ont été effectuées avec le test T (Snedecor GW, 1989). La valeur de P a été fixée à $<0,05$ pour définir la signification statistique.

Résultats et discussion

Résultats

I. Evaluation de la semence après la récolte

Les résultats d'évaluation de la qualité de la semence des deux étalons à la récolte sont enregistrés et présentés dans le tableau ci-dessous :

Partie expérimentale

Tableau 07 : Les caractéristiques séminales individuelles obtenues pendant le protocole

	Paramètres	ANBAR	REZKI
Examen macroscopique	Volume (mL)	70	90
	Couleur et aspect	Blanc laiteux homogène	Blanc laiteux homogène
/	Concentration (spz/mL)	149×10^6	111×10^6
Examen microscopique	Motilité massale	3	3
	Motilité individuelle	80%	75%

II. Evaluation de la mobilité après décongélation

Les effets de différentes concentrations de miel dans le dilueur Kenney modifié supplémenté par les concentration de miel et témoins sur la mobilité des spermatozoïdes des étalons arabe-barbes après décongélation sont rapportés dans les deux tableau ci-dessous :

Tableau 08 : Les résultats générales d'évaluation de la motilité des spermatozoïdes obtenues après décongélation

Concentration en miel	Valeurs de la motilité après décongélation (%)							
	0 h		½ h		1 h		2 h	
	REZKI	AMBAR	REZKI	AMBAR	REZKI	AMBAR	REZKI	AMBAR
MLKM 0% (control)	47%	60%	45%	58%	40%	55%	10%	8%

Partie expérimentale

MEKM 1%	45%	45%	38%	33%	6%	20%	4%	3%
MEKM 2%	68%	70%	65%	64%	60%	55%	55%	7%
MEKM 3%	60%	75%	45%	68%	30%	55%	8%	10%
MEKM 4%	60%	30%	57%	28%	55%	25%	20%	3%
MEKM 5%	55%	25%	48%	22%	45%	20%	8%	3%

Tableau 09 : L'effet du miel additionné au diluant Kenney modifié sur la motilité des spermatozoïdes des étalons arabe-barbe

Enrichissement en miel (%)	Valeurs de motilité après décongélation			
	0 h	½ h	1 h	2h
MLKM 0% (témoin)	53	51.5	47.5	9
MEKM 1%	45	35.5	13	3.5
MEKM 2%	69	64.5	57.5	31
MEKM 3%	67.5	56.5	42.5	9
MEKM 4%	45	42.5	40	11.5
MEKM 5%	40	35	32.5	5

D'après les résultats mentionnés dans le **tableau 09**, il y'avait des différences nettement apparentes entre les différentes concentrations pour la mobilité totale des spermatozoïdes à **0, 1/2, 1 et 2h** après décongélation. Une augmentation de pourcentage des

Partie expérimentale

spermatozoïdes mobiles à été observée en présence de miel d'abeille à **2% et 3%** par rapport au témoin (**0%**), l'enrichissement de milieu de congélation (**Kenney modifié**) pour l'étalon avec le miel d'abeille (**MEKM 2%**) avait augmenté de façon très importante le pourcentage la motilité des spermatozoïdes après décongélation (à **0, 1/2, 1 et 2h**) par rapport au témoin et **MEKM (1%, 4% et 5%)** comme indiqué dans **le tableau 09**. Alors que l'enrichissement en **MEKM à 3%** (à **0, 1/2, 1 et 2h** après décongélation) n'a pas différée de manière très importante des résultats **MEKM 2%** (à **0, 1/2, 1 et 2h** après décongélation) comme indiqué dans **le tableau 09**.

L'analyse statistique des résultats mentionnées précédemment dans les tableaux (**08 et 09**) concernant l'évaluation de la motilité de sperme après décongélation à révéler une différence significative entre le lot témoin (non supplémenté) et **MEKM 1%**, et **MEKM 2%** avec un (**p=0,001, p=0,025**) respectivement par contre l'analyse n'a montré aucune différence significative avec le reste des lots (**P≥0,05**).

Le test t a montré une différence très significative entre le lot **MEKM 1%** et **MEKM 2%**, **MEKM 3%** avec un (**p= 0,001 ; p=0,004**) respectivement sans aucune signification avec le reste des lots.

La comparaison des moyennes entre **MEKM 2% et MEKM 4% MEKM 5%** apporte une nette différence entre ces dernier avec de (**p= 0,007 ; p=0,003**) respectivement sans qu'il est une signification avec le **MEKM 3%**.

Discussion

Plusieurs variantes des médiateurs de dilution ont été utilisés à des fins de traitement de sperme congelé (**Jerez et al., 2016**). La composition des dilueurs de sperme dépend de l'utilisation du sperme, de la température et de la période de stockage. Les spermatozoïdes chez les mammifères ont besoin de substrats exogènes pour remplir diverses fonctions, par exemple ; préserver les ressources énergétiques intracellulaires, les constituants des cellules et plus particulièrement la motilité (**Salisbury et al., 1978**). Le lait (lait écrémé, homogénéisé ou entier) fournit les phospholipides nécessaires à la stabilisation de la membrane à basse température et minimise l'activation de la membrane acrosomique (**Bustamante Filho et al., 2009**). Les sucres sont des composants essentiels des dilueurs pour fournir l'énergie nécessaire à la glycolyse du sperme (**Aboagla et Terada, 2003**).

Dans la présente étude, nous avons utilisé un miel d'abeille de notre sahara (**miel d'euphorbe**) dans un dilueur de sperme d'étalon arabe-barbe comme substrat énergétique, cryoprotecteur et pour son effet antioxydant bénéfique sur la stabilité de la membrane du sperme. Le miel a été utilisé avec un dilueur cryoprotecteur pour des étalons Arabe-barbe à différentes concentrations : **1%, 2%, 3%, 4% et 5%**. Les résultats de la présente étude ont conclu que l'incorporation de différentes concentrations de miel au dilueur de congélation (**MEKM**) augmentait la motilité des spermatozoïdes des étalons après décongélation. Il y avait des valeurs significatives de motilité élevée des spermatozoïdes lorsque le dilueur contenait du miel (**2% et 3%**) à **0, 1/2, 1 et 2h** après la décongélation par rapport au témoin (**0%**).

Le pourcentage de spermatozoïdes étaient significativement plus élevés dans les concentrations de miel (**2% et 3%**) que chez les témoins. L'enrichissement du milieu Kenny modifié en miel d'abeille à (**MEKM 2%**) a montré les enregistrements moyens significatifs les plus élevés concernant la motilité des spermatozoïdes et la viabilité.

Ces résultats sont en accord avec **Olayemi et al. 2011; Jerez et al. 2013** et qui ont rapporté que la présence de miel dans les milieux de congélation augmentait la motilité des spermatozoïdes et améliorait la qualité des spermatozoïdes dans le sperme de bouc, de bélier et de taureau, respectivement. De plus, **Fakhrildin et Alsaadi., 2014** ont indiqué que la supplémentation en miel (**10%**) a la solution de cryoprotecteur de sperme humain entraînait une amélioration de la qualité du sperme après la décongélation. Récemment, **Jerez-Ebensperger et al, 2015** ont conclu qu'ils existait des valeurs significatives de qualité élevée de sperme de bélier (spermatozoïdes mobiles totaux, intégrité de l'acrosome et **HOST**) lorsque le milieu de dilution contenait du miel à **0 et 2 h** après la décongélation et que le fructose pouvait être remplacé par du miel dans le dilueur de sperme de bélier, sans nuire à la qualité du sperme après cryoconservation.

D'un point de vue physique, le miel ne gèlera pas à des températures très basses. La viscosité du miel augmente et deviendra épaisse et se condensera avec la diminution de la température. Le miel a une transition vitreuse comprise entre **-42 et -51 ° C**. En dessous de cette température, le miel entre dans un état vitreux et deviendra un solide amorphe (non cristallin) et empêchera la formation de cristaux de glace (**Kantor. Z et al, 1999**). En outre, le miel possède des propriétés chimiques uniques dans la mesure où il contient un mélange de **25** sucres représentant environ **95% - 97%** de sa matière sèche (principalement du fructose et du

glucose). Outre les saccharides, de nombreuses autres substances bioactives, telles que des acides organiques, des enzymes, des antioxydants et des vitamines, sont présentes dans le miel (**Bogdanov S et al, 2008**). Une telle composition produit divers effets nutritionnels, biologiques et pharmacologiques sur les cellules vivantes, à savoir des activités antimicrobiennes (antivirales, antifongiques et antibactériennes), antioxydantes et antitoxines, anti-inflammatoires, antimutagènes (**Bogdanov S et al, 2008 ; Manyi-Loh CE et al, 2011**). Le fructose et le glucose agissent comme des cryoprotecteurs extracellulaires non pénétrants en raison de leur poids moléculaire élevé et maintiennent l'équilibre osmotique (**Meryman HT, 1971**). De plus, les sucres constituent la principale source d'énergie dont les spermatozoïdes ont besoin pour développer leurs processus métaboliques (**Gil L et al, 2010**). De nos jours, il existe des preuves des effets antioxydants du miel (**Orsolich N et al, 2007 ; Aljady AM et al, 2000**). Les flavonoïdes du miel d'abeille possèdent une activité de balayage des radicaux libres, inhibant ainsi les dommages de l'ADN induit par ces derniers (**Chen CH et al, 2014**). Des études portant sur différentes espèces : bovines (**El-Sheshtawy et al. 2014**), ovines (**Jerez-Ebenspergera RA et al, 2015 ; Jerez-Ebenspergera RA, 2015b**), caprines (**Olayemi et al. 2011**), carpes communes (**Ogretmen F et al, 2014**) et humaines (**Fakhrildin MB et al., 2014**). ont permis de déterminer les propriétés antioxydantes du miel lors de la cryoconservation des spermatozoïdes.

Les scientifiques s'efforcent actuellement de trouver une alternative aux antibiotiques pour enrayer l'utilisation des antibiotiques dans les agents de cryoconservation du sperme. Le miel, un produit d'origine naturelle, possède une activité antibactérienne puissante (**Zoheir et al., 2015**) et constitue une bonne source d'énergie pour les spermatozoïdes en raison de la présence de glucose et de fructose (**Al-Waili., 2004**). Les microorganismes présents dans le sperme réduisent la motilité, la longévité et l'intégrité acrosomique des spermatozoïdes en concurrençant directement les spermatozoïdes avec des nutriments ou en produisant des produits toxiques (**Catry et al., 2010; Morrell et Wallgren, 2014**). Alors que les résultats obtenus par (**Banday, M.N, 2017**) n'ont pas pu être comparés faute de littérature sur cet aspect, où il a conclu que le miel ne pouvait pas être utilisé comme alternative aux antibiotiques dans les milieux de cryoconservations de sperme de béliers mais qui peut être utilisé comme source d'énergie à une concentration supérieure à **2,5%**.

Les résultats de la présente étude sont aussi en accord étroit avec l'étude **d'El-Nattat et al., 2016** qui ont également obtenu une meilleure motilité et une meilleure viabilité des

Partie expérimentale

spermatozoïdes après décongélation avec un taux de miel de **2%, contre 3%, 4% et 5%**. **El-Sheshtawy et al., 2014** ont également signalé une amélioration de la motilité des spermatozoïdes et du nombre de spermatozoïdes vivants à **1%** pour le sperme de taureau cryoconservé et à **3%** pour le sperme de taureau refroidi et autres. Les résultats de **(Mohamed Mahmoud et al, 2017)**, ont montré que l'impact primordial du miel sur les agents de dilution et de cryoconservation du sperme était de soutenir la motilité des spermatozoïdes réfrigérés de buffle. L'effet d'incorporation de miel était évident dans le dilueur, au moment où il entre en contact avec le sperme (**0 h**) et par la suite. L'addition de **2%** de miel était associée au taux de motilité le plus élevé **1, 2 et 4 h** après le refroidissement. Le miel est un mélange de sucres (fructose ~ **38,5%** et glucose ~ **31,0%**) et d'autres composés (**Silva et al., 2016**). **(Olayemi et al., 2011)** ont indiqué que la supplémentation en miel dans un diluant à base de jaune d'œuf maintenait la motilité des spermatozoïdes jusqu'à **6 h à 5 °C**, et son effet dépendait de la proportion de miel par rapport au jaune d'œuf dans le dilueur.

Conclusion

Conclusion

Les résultats obtenus au cours de notre étude nous permettent d'affirmer que la semence équine des étalons arabe-barbe conserve sa motilité et sa longévité pendant au moins 2 heures, lorsqu'on supplémente le dilueur de cryoconservation par un miel d'euphorbe du Sahara Algérien, d'après nos résultats *in vitro*. Ces affirmations sont valables pour les conditions expérimentales utilisées.

Nos résultats ont montré, clairement que la supplémentation en miel d'euphorbe dans le dilueur de sperme d'étalon arabe-barbe (Kenney modifié), **MEKM 2 % et MEKM 3%** a permis d'améliorer la motilité et la longévité des spermatozoïdes en poste-décongélation, par rapport aux groupes témoins (0%) et aux autres concentrations **MEKM 1%, MEKM 4% et MEKM 5%**.

Compte tenu des données de la littérature, il est sans doute possible d'incorporer le miel à une concentration de 2,5 % pour améliorer la motilité, la longévité et d'autres caractéristiques de la semence des différentes espèces. Cela est sans doute dû à la composition du miel riche en sucres, antioxydants et autres substances favorable à la protection des spermatozoïdes contre le stress oxydatif, et la pauvreté du milieu en nutriments.

Perspectives
Et
Recommandations

Perspectives et recommandations

Les résultats que nous avons obtenus dans notre étude ouvrent des perspectives intéressantes, elles nous ont laissé penser à :

- ❖ Augmenter l'effectif de travail (le nombre des étalons et des éjaculats utilisés pour chacun d'entre eux).
- ❖ Approfondir les examens utilisés (système CASA) et à élargir les paramètres d'évaluation de la semence pour l'obtention de résultats de plus en plus objectives et précises.
- ❖ Essayer d'inséminer des juments avec ces semences congelées pour savoir l'effet in vivo et calculé la fertilité.
- ❖ Tester d'autres types et d'autres doses de miel ainsi que de vérifier son effet avec d'autres dilueurs de congélation pour l'étalon.
- ❖ Nous espérant ainsi améliorer la clarté du milieu de cryoconservation pour une visualisation plus claire des spermatozoïdes permettant une évaluation optimale de la qualité du sperme congelé, le lait en poudre entier pourrait être remplacé par du lait écrémé ou semi écrémé.
- ❖ Une comparaison de notre milieu de congélation avec autres milieux de congélation commercialisés pour mieux juger son effet sur les paramètres de sperme d'étalon.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

Aboagla EM, Terada T. 2003. Trehalose-enhanced fluidity of the goat sperm membrane and its protection during freezing. *Biol Reprod*, 69:1245-1250.

Akerejola OO, Ayivor MD, Adams EW. 1978. Equine squamous cell carcinoma in Northern Nigeria. *Vet Rec*, 7, pp. 336-337

Allimant M. 2010. Actualités sur les méthodes d'évaluation de la qualité de la semence de l'étalon. Thèse de doctorat vétérinaire, Université Claude- Bernard, Lyon, 138p.

Allison N, Robert B, Moeller J. 1999. Bilateral testicular leiomyosarcoma in a stallion. *J Vet Diagn Invest*, 11, pp. 179-182.

Alvarenga M.A., Papa F.O., Landim-Alvarenga F.C. 2005. Medeiros A.S. Amides as cryoprotectants for freezing stallion semen: a review. *Anim. Reprod. Sci.* 89, 105-113

Al-Waili, NS 2004. Investigating the antimicrobial activity of natural honey and its effects on the pathogenic bacterial infections of surgical wounds and conjunctiva. *J. Med. Food.* 7: 210-222.

Amann R.P., Graham J.K. 2011. Spermatozoal function. In: McKinnon A.O., Squires E.L., Vaala W.E. (Eds), *Equine reproduction*. 2nd edition. Wiley-Blackwell: Oxford, 1053-1085.

Amann RP. 1993. Physiology and Endocrinology. In: Mckinnon AO, VOSS JL (eds), *Equine Reproduction*, 1ed., Lea & Febiger eds, Philadelphia, pp. 1137-1154.

Angus O. McKinnon, Edward L. Squires, Wendy E. Vaala and Dickson D. Varner. 2011. *Equine Reproduction*, Second Edition. Blackwell Publishing Ltd.

Banday, M. N.; Lone, F. A.; Rasool, F.; Rather, H. A. and Rather, M. A, 2017. Article: Does natural honey act as an alternative to antibiotics in the semen extender for cryopreservation of crossbred ram semen?

Baracaldo M.I. Steps for freezing bovine semen : from semen collection to the liquid nitrogen tank. [En ligne]. 2007. Adresse URL : http://www.uesc.br/cursos/pos_graduacao/mestrado/animal/2007/baracaldo_et_at_2007.pdf, consulté le 02/04/2014. bibliografia

Barbas J. P. et Mascarenhas R. D. 2009. Cryopreservation of domestic animal sperm cells. *Cell Tissue Bank*. Vol. 10, n° 1, p 49-62.

Barone R, Tagand R. 1956. Anatomie des équidés domestiques. Tome second. Splanchnologie et angiologie. Fascicule III. Appareil uro-génital. Péritoine, Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon, pp. 633-1010.

Baronne R. 2001. Chapitre II : Appareil génital mâle. In : Anatomie compare des mammifères domestiques. Tome 4. Splanchnographie II. Vigot 83-250.

Barrier-Battut I. 2013. Collecte et traitement de la semence d'étalon. *Equ'idée*. Article 2-7

Batellier F, Duchamp G, Vidament M, Arnaud G, Palmer E, Magistrini M. 1998. Delayed insemination is successful with a new extender for storing fresh equine semen at 15 degrees C under aerobic conditions. *Theriogenology*. 50 (2) 229-36.

Batellier F, Vidament M, Fauquant J, Duchamp G, Arnaud G, Yvon JM, Magistrini M. 2001. Advances in cooled semen technology. *Anim Repro Sci.* 68 :181-90.

Références bibliographiques

- Batellier F. et al. 2001** Advances in cooled semen technology. *Anim Reprod Sci.* 68 (3-4) 181-90.
- Baumber J., Ball B.A., Linfor J.J., Meyers S.A. 2003.** Reactive oxygen species and cryopreservation promote DNA fragmentation in equine spermatozoa. *J. Androl.*, 24, 621-628
- Bjorndahl L., Soderlund I., Kvist U. 2003.** Evaluation of the one-step eosin-nigrosin staining technique for human sperm vitality assessment. *Hum. Reprod*18, 813-816.
- Blanchard TL, et al. 2003.** Manual of equine reproduction. 2nd edition. Mosby
- Bo G. Crabo, DVM, PhD. 2001.** Physiological Aspects of Stallion Semen Cryopreservation
- Bogdanov S, Jurendic T, Sieber R, Gallmann P. 2008.** Honey for nutrition and health: a review. *J Am Coll Nutr*; 27: 677-689.
- Braun J., Sakai M., Hochi S., Oguri N. 1994.** Preservation of ejaculated and epididymal stallion spermatozoa by cooling and freezing. *Theriogenology*, 41, 809-818.
- Brinsko S.P., Blanchard T.L., Rigby S.L., Love C.C., Varner D.D. 2003.** Effects of dead spermatozoa on motion characteristics and membrane integrity of live spermatozoa in fresh and cooled-stored equine semen. *Theriogenology*, 59,735-742.
- Bustamante Filho IC, Pederlozzi CD, Sgaravatti AM, Gregory RM, Dutra Filho CS, Jobim MIM, Mattos RC. 2009.** Skim Milk-egg based semen extender compensates for non-enzymatic antioxidant activity loss during equine semen cryopreservation. *Anim Reprod*, 6:392-399.
- Catry, B; Van Duijkeren, E; Pomba, MC; Greko, C; Moreno, MA; Pyorala, S and Torneke, K 2010.** Reflection paper on MRSA in food-producing and companion animals, epidemiology and control options for human and animal health. *Epidemiol. Infect.*, 138: 626-644.
- Chen CH, Weng M, Wu CH, Lin J. 2004.** Comparison of radical scavenging activity, cytotoxic effects and apoptosis induction in human melanoma cells by Taiwanese propolis from different sources. *Evid Based Complement Altern Med.* 1(2): 175-185.
- Chirent Mylène. 2015.** Les alternatives à la castration chirurgicale chez l'étalon ; Thèse Présentée à l'université Claude Bernard – Lyon.
- Cochran JD, Amann RP, Froman DP, Pickett BW. 1984.** Effects of centrifugation, glycerol level, cooling to 5°C, freezing rate and thawing rate on the post-thaw motility of equine sperm. *Theriogenology*; 22: 25-38.
- Dacheux J-L. et Dacheux F. 2001.** L'épididyme et les glandes annexes. In : La reproduction chez les mammifères et l'homme. Nouvelle Edition entièrement refondue. INRA Editions. Ellipses.
- Dadoune J-P., Demoulin A. 2001.** « Structure et fonction du testicule » dans « La reproduction chez mammifères et l'homme » de C. THIBAUT, Levasseur édition marketing, p 256 à 288.
- Daels P.F. 2003.** New technics of artificial insemination in the mare. In: Belgian Equine Practitioners Society (Ed.), Proceedings de la 20^e journée d'étude de la Belgian Equine Practitioners Society, Bruxelles.

Références bibliographiques

- Day John G. et Stacey Glyn N. 2007.** Methods in molecular biology. Cryopreservation and freeze-drying protocols. Second Edition. Humana Press Inc. 365p.
- Delphine, Marie, Ghislaine Fehrenbach. 2003.** L'éventration post-castration chez le cheval ; Thèse Présentée à la faculté de médecine de Créteil.
- Drion P-V, Beckers J.F, Ectors F, 1993.** « Physiologie de la reproduction ». Université de Liège, Faculté de médecine vétérinaire Dumont P., 1997. « Point Vétérinaire ». Vol 28. N°185, Août –Septembre.
- Dumon Christian. 2007.** insémination artificielle dans l'espèce canine : Actualités. Bull. Acad. Vét. France. Tome 160 - N°2
- Edmond A.J., Teague S.R., Brinsko S.P., Comerford K.L., Waite J.A., Mancill S.S., Love C.C., Varner D.D. 2008.** Effect of density-gradient centrifugation on quality and recovery rate of equine spermatozoa. Anim. Reprod. Sci. 107, 318-318.
- El-Nattat, WS; El-Sheshtawy, RI; El-Batawy, KA; Shahba, MI and El-Seadawy, IE 2016.** Preservability of buffalo bull semen in tris-citrate extender enriched with bee's honey. J. Innov. Pharm. Biol. Sci., 3: 180-185.
- El-Sheshtawy RI, El-Nattat WS, Sabra HA, Ali AH. 2014.** Effect of honey solution on semen preservability of local breeds of cattle bulls. Wld Appl Sci J. 32(10): 2076-2078.
- Fakhrildin MB, Alsaadi RA. 2014.** Honey supplementation to semen freezing medium improves human sperm parameters post-thawing. J FAM Reprod Health; 8(1): 27-31.
- Florence Batellier (chap. 14 et 16), Elisabeth Blesbois (chap. 13 et 15), (Jean-Pierre Brillard (chap. 14, 15 et 17- poules reproductrices), Marina Gorovoum (chap. 14 et 16), (François Héroult (chap.17, palmipèdes gras), Yvan Heyman (chap.6), Guy Perrier (chapt.10), Marie-Claude Rogier-Saderne (chap. 17, palmipèdes gras), Fabrice Savary (chap. 17, faisans) et Xavier Vignon (chap.6). 2005.** Reproduction des animaux d'élevage (2^{ème} édition).
- G. Decuadro-Hansen. 2004.** La réfrigération et la congélation du sperme : expérience chez l'animal Chilled and frozen semen : the animal experience
- Gadella B.M. 2008.** Sperm membrane physiology and relevance for fertilization. Anim. Reprod. Sci., 107, 229-236.
- Gadella, B. M., R. Rathi, J. F. Brouwers, T. A. A. Stout et B. Colenbrander. 2001.** Capacitation and the acrosome reaction in equine sperm. Anim Reprod Sci. 68 : 249-265.
- Gadella, B.M., Tsai, P.S., Boerke, A., Brewis, I.A. 2008.** Sperm head membrane reorganisation during capacitation. Int J Dev. Biol 52, 473-480.
- George G. 1996.** « Cours d'histologie ». Cours du PCEM.
- Gil L, Mascaró F, Mur P, Gale I, Silvia A, Gonz´alez N, et al. 2010.** Freezing ram semen: the effect of combination of soya and rosemary essences as a freezing extender on post-thaw sperm motility. Reprod Domest Anim. 45: 91.
- Gilmore J.A., Liu J., Woods E.J., Peter A.T., Critser J.K. 2000.** Cryoprotective agent and temperature effects on human sperm membrane permeabilities: convergence of theoretical and empirical approaches for optimal cryopreservation methods. Hum. Reprod. 15, 335-343.

Références bibliographiques

Glander H.J., Schaller J., Ladusch M. 1990. Eine einfache Methode zur Separierung von frischen und kryokonservierten Humanspermien mittels einer Dextran-Visostrast-Dichtegradientenzentrifugation. Zentralbl. Gynakol, 112, 91-97.

Gravance C.G., Champion Z., Liu I.K., Casey P.J. 1997. Sperm head morphometry analysis of ejaculate and dismount stallion semen samples. Anim. Reprod. Sci., 47, 149-155.

Hanzen C. 2006. « Propédeutique de l'appareil reproducteur mâle et examen du sperme des ruminants, équidés et porc ». Cours de reproduction, université de Liège, Belgique

Heiskanen ML, Huhtinen M, Pirhonen A, Maenpaa PH. 1994b. Insemination results with slow-cooled stallion semen stored for approximately 40 hours. Acta. Vet. Scand. 35 (3) 257-62.

Heiskanen ML, Huhtinen M, Pirhonen A, Maenpaa PH. 1994a. Insemination results with slow-cooled stallion semen stored for 70 or 80 hours. Theriogenology. 42(6) 1043-51.

Heymon Y., Vignon X. 2005. Reproduction des animaux d'élevage. Educagri

Hoogewijs M., Rijsselaere T., De Vliegher S., Vanhaesebrouck E., De Schauwer C., Govaere J., Thys M., Hoflack G., Van Soom A., De Kruif A. 2010. Influence of different centrifugation protocols on equine semen preservation. Theriogenology, 74, 118-126.

<https://slideplayer.fr/slide/3395368/>, consulté le 29/05/2019.

Isabelle Barrier-Battut. 2013. Collecte et traitement de la semence d'étalon : quoi de neuf ? Le magazine en ligne de l'actualité technique et scientifique équine. Institut Français du Cheval et de l'Équitation.

Jerez R, Gil L, González N, Luño V, Olaciregui M, Martínez F, et al. 2013. Rosemary honey as natural energetic source on refrigeration ram semen. Reprod Dom Anim. 48: 1.

Jerez R, González N, Olaciregui M, Luño V, de Blas I, Gil L. 2016. Use of soy milk combined with different cryoprotectants for the ram semen cryopreservation. Small Rumin Res, 134:34-38.

Jerez-Ebensperger R, Gil L, Gonzales N, De Blas I. 2015b. The combined effect of use of honey, garlic (*Allium Sativum* L.) and skimmed milk as an extender for chilling sheep semen. Cryo Lett; 36(4): 243-251.

Jerez-Ebensperger RA, Luño V, Olaciregui M. 2015. González N, Blas I de, Gil L. Effect of pasteurized egg yolk and rosemary honey supplementation on quality of cryopreserved ram semen. Small Rumin Res; 130: 153-156.

John Dascanio and Patrick McCue. 2014. Equine Reproductive Procedures, First Edition. Edited by John Wiley & Sons, Inc. Published 2014 by John Wiley & Sons, Inc. 560p (p333).

Johnson L., Blanchard L., Varner D., Scrutchfield W. L. 1997. "Factors Affecting Spermatogenesis in the Stallion." Theriogenology 48(7), 1199-1216.

Johnston S.D., Root Kustritz M.V. ET Olson P.N.S. (2001). Canine and Feline Theriogenology. Saunders Company. 592p.

Juan C. Samper, 2009. Equine breeding management and artificial insemination. Second edition, 299p (p34).

Références bibliographiques

- Kantor Z, Pitsi G, Thoen J. 1999.** Glass transition temperature of honey as a function of water content as determined by differential scanning calorimetry. *Agric Food Chem.* 47: 2327-2330.
- Katila T. 1997.** Procedures for handling fresh stallion semen. *Theriogenology.* 48(7) 1217-27.
- Knobil E, Neill JD. 1999.** Spermatozoa In: *Encyclopedia of Reproduction.* Volume 4 (Pro-Z); 586-596.
- Kobayashi T., Kaneko S., Hara I., Park Y.J., Sato h., Ohno T., Nozawa S. 1991.** Concentrating human sperm before cryopreservation. *Andrologia,* 23, 25-28.
- Leeb H., Rennhofer G. 1954.** Ueber die Beurteilung der Vitalitat menschlicher Spermien mit der Eosin-Nigrosin-Farbung nach Blom. *Wien. Med. Wochenschr,* 104, 877-878.
- Loomis P.R. 2006.** Advanced methods for handling and preparation of stallion semen. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 22, 663-676.
- Lopez M.L., Olea N., Retamal C.A. 2007.** Post-testicular changes in the density and distribution of intramembrane particles of stallion sperm surface domains. *Anim. Reprod. Sci.,* 100, 204-210.
- Manyi-Loh CE, Clarke AM, Ndip RN. 2011.** An overview of honey: therapeutic properties and contribution in nutrition and human health. *Afr J Microbiol Res.* 5: 844-852.
- Marc Stéphanie. 2015.** Thèse : Actualités En Cryoconservation Des Semences Des Principales Espèces D'intérêt Vétérinaire, Université CLAUDE-BERNARD - LYON I (Médecine - Pharmacie).
- Marie Allimant. 2010.** Thèse: Actualités sur les méthodes d'évaluation de la Qualité de la semence de l'étalon. Université Claude-Bernard - Lyon I.
- Mazur, P. 1968.** Physical and chemical changes during freezing and thawing of cells, with special reference to blood cells. *Bibl Haematol* 29 764-77.
- Mc. Donald Me. 1980.** « Veterinary endocrinologie and reproduction ». Lea ET Febiger edition 3rd 560p. **Albert et Jean. 2001.** « Biologie du développement » .5^{ème} édition de l'abrégé.
- McGreevy PD, Cripps PJ, French NP, Green LE, Nicol CJ. 1995.** Management factors associated with stereotypic and redirected behaviors in the Thoroughbred horse. *Equine Vet J;* 27:86-91
- Mckinnon A.O., Squires E.L., Vaala W., Varner D.D. 1993.** *Equine Reproduction Second Edition.* London, Wiley-Blackwell. (3288p).
- Meryman HT. 1971.** Cryoprotective agents. *Cryobiology.* 8:173-183.
- Meskini Zakaria. 2016-2017.** Mémoire de master ; l'insémination artificielle chez les caprins de la race arbia dans la région de Tiaret ; Université Abdelhamid Ibn Badis-Mostaganem.
- Mohamed Mahmoud Moustafa kaniel, Ahmed Reda Mohamed, 2017.** Elkhawagah Effect of honey supplementation on Egyptian buffalo semen

Références bibliographiques

- Moore A.I., Squires E.L., Graham J.K. 2005.** Effect of seminal plasma on the cryopreservation of equine spermatozoa. *Therio-genology*, 63, 2372-2381.
- Morrell J.M. 2006.** Update on semen technologies for animal breeding. *Reprod. Domest. Anim.*, 41, 63-67
- Neild D.M., Brouwers J.F., Colenbrander B., Aguero A., Gadella B.M. 2005.** Lipid peroxide formation in relation to membrane stability of fresh and frozen thawed stallion spermatozoa. *Mol. Reprod. Dev.*, 72,230-238.
- Neto C.R., Monteiro G.A., Sancler-Silva Y.F.R., Papa P., Guasti P.N., Resende H.L., Papa F.O., Dellaqua JR. J.A. et Alvarenga M.A. 2014.** Comparison of different freezing extenders for semen cryopreservation from stallions with poor and good semen freezability. *Journal of Equine Veterinary Science*. Vol. 1, n° 34, pp. 58-60.
- Noakes D.E., Parkinson timothy j. ET England G.C. 2009.** *Veterinary reproduction and obstetrics*. Ninth edition. Saunders Elsevier. 961p..
- Ogretmen F, Inanan BE. 2014.** Evaluation of cryoprotective effect of Turkish pine honey on common carp (*Cyprinus carpio*) spermatozoa. *Cryo Lett.* 35(5): 427-437.
- Olayemi FO, Adenigi DA, Oyeyemi MO. 2011.** Evaluation of sperm motility and viability in honey included egg yolk based extenders. *Glob Vet*; 7 (1): 19-21.
- Oliveira C.H., Vasconcelos A.B., Souza F.A., Martinsfilho O.A., Silva M.X., Varago F.C., Lagares M.A. 2010.** Cholesterol addition protects membrane intactness during cryopreservation of stallion sperm. *Anim. Reprod. Sci.*, 118, 194-200.
- Orsolich N, Basic I. Cancer chemoprevention by propolis and its polyphenolic compounds in experimental animals. In: Singh VK, Govil JN, Arunachalam C, editors. 2007.** Recent progress in medicinal plants. USA: Studium Press LLC, p. 55-113.
- Ortega Ferrusola C., Garcia B.M., Gallardo Bolanos J.M., Gonzalez Fernandez L., Rodriguez Martinez H., Tapia J.A., Pena F.J. 2009.** Apoptotic markers can be used to forecast the freezeability of stallion spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.*, 114, 393-403.
- P.L. Senger, Ph. D. 2003.** Pathways to pregnancy and parturition; second edition; Chapter 3, p51 (367P).
- Pickett B.W. 1993.** Factors affecting sperm production and output. In : MCKINNON A.O., VOSS Chapitre 2 : physiologie de la reproduction de l'étalon : J.L. *Equine Reproduction*. Philadelphia: Lea and Febiger, 1993, 689-699.
- Pillet E., Labbe C., Batellier F., Duchamp G., Beaumal V., Anton M., Desherces S., Schmitt E. et Magistrini M. 2012.** Liposomes as an alternative to egg yolk in stallion freezing extender. *Theriogenology*. Vol. 77, n° 2, pp. 268-279.
- Ponsart C., Joly C., Le Guienne B., Beaujean N., Le bourhis D., Gérard O., Mermillod P. et Locatelli Y. 2014.** Biotechnologies des gamètes et de l'embryon. In : SAINT-DIZIER M. et CHASTANT-MAILLARD S. *La reproduction animale et humaine*. Editions Quae. 752p.
- Ponthier J., Van Den Berghe F., Parrilla-Hernandez S., Hanzen C. et Deleuze S. 2014.** Congélation du sperme dans l'espèce équine : état des lieux et perspectives.

Références bibliographiques

- Prins G. 1998.** Semen, In: Encyclopedia of reproduction. Volume 4. Knobil E., Neill J.D. Academic Press.
- Reece W.O. 1997.** Male Reproduction. In: Physiology of Domestic Animals. 2nde edition. Williams and Wilkins. 370p.
- Rezzi Léa. 2016.** Prise en charge des tumeurs de l'appareil génital chez les équidés ; Thèse présentée à l'université Claude Bernard – Lyon.
- Ricker J.V., Linfor J.J., Delfino W.J., Kysar P., Scholtz E.L., Tablin F., Crowe J.H., Ball B.A., Meyers S.A. 2006.** Equine sperm membrane phase behavior: the effects of lipid-based cryoprotectants. Biol. Reprod74, 359-365.
- Roger T. 2009.** L'appareil génital mâle des Mammifères domestiques. Documents de cours de l'Unité d'anatomie, Vetagro-sup, Campus vétérinaire de Lyon, 54pp.
- Salazar J.L., Hayden S.S., Waite J.A., Comerford K.L., Edmond A.J., Teague S.R., Love C.C., Varner D.D. 2008.** Effect of cryopreservation protocol on post-thaw characteristics of stallion spermatozoa. Anim. Reprod. Sci.107, 347-348
- Salisbury GW, Van Demark NL, Lodge JR. 1978.** Extenders and extension of unfrozen semen. In: Salisbury GW (Ed.). Physiology of Reproduction and Artificial Insemination of Cattle. San Francisco, CA: W.H. Freeman. pp. 442-493.
- Senger P.L. 2005,** Pathways to pregnancy and parturition. Current Conceptions: Pullman, 373 p.
- Shoenian S, 2005.** «Reproduction in the ram». Prolongation de coopérative du Maryland. Université de Maryland.
- Silva PM, Gauche C, Gonzaga LV, Costa ACO, Fett R. 2016.** Honey: chemical composition, stability and authenticity. Food Chem, 196:309-323. Warriach HM,
- Snedecor GW, Cochran WG. 1989.** Statistical methods. 8th ed. Ames, IA, USA: Iowa State Univ.
- Sostaric E., Aalberts M., Gadella B.M., Stout T.A.E. 2008.** The roles of the epididymis and prostasomes in the attainment of fertilizing capacity by stallion sperm. Anim. Reprod. Sci., 107, 237-248.
- Steven P. Brinsko, Terry L. Blanchard, Dickson D. Varner, James Schumacher, Charles C. Love, Katrin Hinrichs, David L. Hartman. 2011.** Manual of equine reproduction – 3rd edition, 325p (p161-162).
- Thibault C, 1975.** « La fécondation ». 1 vol. Masson 1995. 20.
- Thibault C, Beaumont A, Levasseur M-C. 1998.** « La reproduction des vertébrés ». Edition MASSON, Paris.
- Thibault C. 2001.** La reproduction chez les mammifères et l'homme. Ellipses.
- Tibary, A., Bakkourym. 2005.** Equine Reproduction. Tome2. L'étalon. Vol. 2. Actes Éditions. Institut agronomique et vétérinaire Hassan II, Maroc, 554p.
- Vaissaire J-P. 1977.** Sexualité et reproduction des mammifères domestiques et de laboratoires. Maloine S.A. éditeur. 457p.p81-155.

Références bibliographiques

- Varner DD, Blanchard TL, Love CL, Garcia MC, Kenney RM. 1988.** Effects of cooling rate and storage temperature on equine Spermatozoal motility parameters. *Theriogenology*. 29 (5) 1043-54.
- Varner DD. 2008.** Developments in stallion semen evaluation. *Theriogenology*; 70:448-62.
- Vidament M., Ecot P., Noue P., Bourgeois C., Magistrini M., Palmer E. 2000.** Centrifugation and addition of glycerol at 22 degrees C instead of 4 degrees C improve post-thaw motility and fertility of stallion spermatozoa. *Theriogenology*, 54, 907-919.
- Vidament M., Yvon J.M., Couty I., Arnaud G., Nguerkamfeugang J., Noue P., Cottron S., Le Tellier A., Noel F., Palmer E., Magistrini M. 2001.** Advances in cryopreservation of stallion semen in modified INRA82. *Anim. Reprod. Sci.* 68, 201-218.
- Waite J.A., Love C.C., Brinsko S.P., Teague S.R., Salazar J.L., JR., Mancill S.S. 2008.** Factors impacting equine sperm recovery rate and quality following cushioned centrifugation. *Theriogenology*, 70,704-714.
- Wessel MT, Althouse GC. 2006.** Validation of an objective approach for simultaneous assessment of viability and motility of fresh and cooled equine spermatozoa. *Animal Reproduction Science*; 94:21-2.
- Yoann, Jean, François. 2008.** Mémoire de doctorat sous le thème : Etude sur la conservation de la semence équine dans une boîte de transport jetable exposée à différentes températures positives pendant 22 heures. La faculté de médecine de Créteil.
- Zoheir, KMA; Harisa, GI; Abo-Salem, OM and Ahmad, SF. 2015.** Honey bee is a potential antioxidant against cyclophosphamide-induced genotoxicity in albino male mice. *Pak. J. Pharm. Sci.*, 28: 973-981.