

*REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE*

*UNIVERSITE IBN KHALDOUN DE TIARET
INSTITUT DES SCIENCES VETERINAIRES
DEPARTEMENT DE SANTE ANIMALE*

*PROJET DE FIN D'ETUDES EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE DOCTEUR
VETERINAIRE*

SOUS LE THEME

*GUIDE PRATIQUE DE L'INSEMINATION
ARTIFICIEL CHEZ LA JUMENT*

PRESENTÉ PAR:

Mr Tihal Mohamed Yacine

Mr Rebah Mohamed Redha

ENCADREE PAR:

Dr Ayad Mohamed Amine

*ANNEE UNIVERSITAIRE
2016-2015*

Remerciement

Au terme de se travail, je tien a éxprimer ma profonde gratitude et mes sinséres remerciement a mon tuteure de projet de fain d'étude Dr : AYAD MOUHAMED AMI NE qui a accépter d'encadrer mes travaux.

Mes plus vif remerciement s'adressent aussi a tout le cadre professoral et administratife de l'institu vétérinaire de tiaret. Mes remerciement a mes chéres parents qui son eux tout cela n'aurer jamais etait possible, je n'oublierai jamais leur dévouement et leures sacrifices. j'espère pouvoire un jour les remercier a la hauteur de se qu'ils m'ont apportés

Mes remerciement vont enfin a tout persone qui a contribuer de prés ou de loin a l'élaboration de se memoire.

Dédicace

Je dédie ce mémoire,

*à tous ceux et toutes celles
qui m'ont accompagné et soutenu
durant ces années de formation*

Sommaire

| | |
|--|----|
| I. INTRODUCTION : | 1 |
| 1. HISTORIQUE : | 1 |
| 2. LES AVANTAGES : | 1 |
| 2.1 Au niveau sanitaire : | 1 |
| 2.2 Au niveau de la gestion des étalons : | 2 |
| 2.3 Au niveau de la gestion des juments : | 2 |
| 2.4 Au niveau génétique : | 3 |
| 2.5 Au niveau de la qualité technique : | 3 |
| 3. LES INCONVENIENTS : | 3 |
| 3.1 Au niveau génétique : | 3 |
| 3.2 Au niveau de coût : | 4 |
| 3.3 Au niveau technique : | 4 |
| II. ANATOMIE DE L'APPAREIL GENITAL DE LA JUMENT : | 6 |
| 1. PORTION GLANDULAIRE : | 6 |
| 1.1. Les ovaires : | 6 |
| 2. PORTION TUBULAIRE : | 7 |
| 2.1. L'utérus : | 8 |
| 2.2. Le vagin : | 8 |
| 3. PORTION URO-GENITALE : | 10 |
| 3.1. Le vestibule du vagin : | 10 |
| 3.2. La vulve et le périnée : | 10 |
| III. ANATOMIE DE L'APPAREIL REPRODUCTEUR DE L'ETALON : | 12 |
| 1. PORTION GLANDULAIRE : | 12 |
| 1.1. Les testicules : | 12 |
| 1.2. Conformation intérieure et structure : | 12 |
| 2. PORTION TUBULAIRE : | 13 |
| 2.1. Les voies spermatiques intra-testiculaires : | 13 |
| 2.2. Les voies spermatiques extra-testiculaires : | 14 |
| 3. LES GLANDES ANNEXES DE L'APPAREIL GENITAL MALE : | 15 |
| 3.1. Les vésicules séminales : | 15 |
| 3.2. La prostate : | 15 |
| 3.3. Les glandes de Cowper : | 16 |
| 4. LA PARTIE LIBRE DU PENIS : | 17 |
| VI. LA RECOLTE DU SPERME DE L'ETALON : | 19 |
| 1. LE VAGIN ARTIFICIEL : | 19 |
| 1.1 Choix du vagin artificiel : | 19 |
| 1.2 Préparation du vagin artificiel : | 21 |
| 2. CARACTERISTIQUES DU MANNEQUIN : | 22 |
| 3. LA RECOLTE DU SPERME : | 23 |
| 3.1 La préparation de l'étalon pour la récolte : | 23 |
| 3.2 La préparation de la jument pour la récolte : | 24 |
| 3.3 La récolte : | 25 |

| | |
|--|----|
| V. TECHNIQUES GENERALES DE MANIPULATION DE LA SEMENCE : | 28 |
| 1. EVALUATION MACROSCOPIQUE DE LA SEMENCE : | 29 |
| 2. DETERMINATION DE LA CONCENTRATION EN SPERMATOZOÏDES : | 30 |
| 2.1 Utilisation de la cellule hématimétrique : | 30 |
| 2.2 Utilisation du spectrophotomètre : | 32 |
| 3. DETERMINATION DU NOMBRE TOTAL DE SPERMATOZOÏDES PAREJACULAT : | 33 |
| 4. EVALUATION DE LA MOBILITE DES SPERMATOZOÏDES : | 34 |
| 5. CONSERVATION DE LA SEMENCE : | 37 |
| VI. TECHNIQUES D'INSEMINATION ARTIFICIELLE : | 39 |
| 1. LA NATURE DE LA SEMENCE ET LES TRAITEMENTS SUBIS : | 39 |
| 2. SUIVI DES JUMENT : | 40 |
| 3. PREPARATION DE LA JUMENT : | 40 |
| 3.1 Lavage de la jument : | 40 |
| 3.2 Séchage : | 41 |
| 4. PREPARATION DU CATHETER : | 42 |
| 5. DOSE EN TUBE : | 42 |
| 6. DOSE EN SERINGUE : | 43 |
| 7. INSEMINATION PROPREMENT DITE : | 44 |
| 8. L'INSEMINATION ARTIFICIELLE PROFONDE : | 45 |
| VI. CONCLUSION : | 47 |
| VII. BIBLIOGRAPHIE : | 50 |

Liste des figures :

| | |
|---|----|
| Figure 1 : Conformation de l'ovaire chez la jument. [3] | 7 |
| Figure 2 : Appareil génital d'une jument. Vue ventrale après isolement et étalement. [3]..... | 9 |
| Figure 3 : coupe longitudinale d'un testicule et de l'épididyme d'un étalon [12] | 13 |
| Figure 4 : schéma d'un épидидyme humain [13] : a = tête ; b = corps ; c+d = queue..... | 14 |
| Figure 5 : coupe médiane de l'exploration rectale d'un étalon [12] | 16 |
| Figure 6 : coupe longitudinale de la partie libre du pénis [12] | 17 |
| Figure 7 : préparation d'un vagin artificiel de type Missouri (mise en place du manchon de protection à usage unique à l'intérieur et remplissage d'eau)..... | 21 |
| Figure 8 : mannequin de récolt | 22 |
| Figure 9 : : un seau d'eau tiède | 23 |
| Figure 10 : papier absorbant | 23 |
| Figure 11 : lavage de la verge de l'étalon | 24 |
| Figure 12 : séchage de la verge de l'étalon..... | 24 |
| Figure 13 : des entrave pour contention | 24 |
| Figure 14: Chaussou de monte pour jument En feutre..... | 25 |
| Figure 15 : une jument entravée avant la récolte | 25 |
| Figure 16 : cuve pour bain-marie contenant le milieu de dilution et les récipients allant accueillir le sperme, à température corporelle (36.8°C)..... | 28 |
| Figure 17 : cellules de Thoma (d'après les laboratoires Fiers) : les spermatozoïdes présents dans les grands carrés sont comptés. | 31 |
| Figure 18 : l'observation des spermatozoïdes sur une cellule de Thoma (d'après Milian Swiss) | 32 |
| Figure 19 : photomètre AccuRead®(d'après IMV technologies) | 33 |
| Figure 20 : photomètre AccuRead®(d'après IMV technologies) | 34 |
| Figure 21 : microscope à plaque chauffante | 36 |
| Figure 22: lavage a la douchette | 41 |
| Figure 23: séchage de la vulve..... | 42 |
| Figure 24: Dose en seringue | 43 |
| Figure 25: l'insémination artificiel chez une jument | 44 |
| Figure 26 : insemination profonde | 45 |

Listes des tableaux :

| | |
|---|----|
| Tableau 1: les différents types de vagins artificiels | 20 |
| Tableau 2: description des dilueurs de semence couramment employés | 35 |
| Tableau 3 : les différents types de semence utilisés dans l'insémination artificielle chez la jument | 39 |

INTRODUCTION

Introduction

Introduction :

Certains chevaux, de par leurs aptitudes exceptionnelles, ou de par leurs caractéristiques spéciales, représentent un patrimoine génétique très important aux yeux de leurs éleveurs. D'une manière plus générale, un éleveur voulant agrandir son cheptel peut choisir de le faire des différentes façons. En effet selon les élevages de chevaux (cheval de trait, cheval de course), différentes techniques de reproduction sont utilisées. Il existe la monte en liberté, la saillie monte en main et enfin l'insémination artificielle.

1. Historique :

Au X^{IV}e siècle les Arabes ont utilisé l'insémination artificielle chez le cheval. Les premières tentatives en France ont eu lieu en 1887 avec Benoit et Repiquet. Ivanov et l'école russe en 1912 sont à l'origine des premières applications pratiques (Nicolich, 1989).

La reproduction du cheval a été étudiée dans les années 1950 par Nishikawa au Japon qui a mis au point les premiers dilueurs pour la semence d'étalon (Nishikawa, 1975).

En France, l'INRA a mené des recherches sur l'insémination artificielle des équidés à partir de 1978, dans le laboratoire d'Eric Palmer à la station de physiologie de la reproduction de Nouzilly (près de Tours).

A partir de 1980, des juments ont été inséminées en Bretagne (Fauquenot, 1987 ; Magistini, 1990). La congélation du sperme a été étudiée dès 1951-1953 par Skatin de l'Institut du cheval à Moscou (Nicolich, 1989).

En 2009, 70 % des juments sont inséminées en France. Les *haras nationaux* hébergent des étalons et ont parfois une jumenterie annexe pour assurer la reproduction des équidés soit par insémination, soit par saillie naturelle. Ils interviennent au niveau de 24 pôles hippiques répartis sur la France. Ce sont maintenant des prestataires de service pour les éleveurs, les organisations socioprofessionnelles et les collectivités territoriales. Leur siège est à Pompadour.

2. Les avantages :

2.1 Au niveau sanitaire :

- L'absence de contact direct entre les reproducteurs protège l'étalon des éventuelles juments contaminées, Elle permet d'éradiquer progressivement des maladies vénériennes en effectuant des contrôles sanitaires très stricts sur les étalons et dans une moindre mesure sur les juments.

Introduction

- Les élevages sont protégés contre les maladies contagieuses, en limitant les déplacements et les contacts entre animaux, l'idéal, au niveau sanitaire est l'IA à domicile.
- La contamination microbienne moyenne de l'utérus à chaque dépôt de semence est diminuée (qualité de la récolte, division de l'éjaculat, utilisation d'antibiotique dans les dilueurs, nettoyage de la jument, matériel stérile pour l'insemination).

2.2 Au niveau de la gestion des étalons :

- par des récoltes 3 fois par semaine, on récupère la totalité des spermatozoïdes produits, les étalons sont économisés par :
 - La diminution du nombre de sauts
 - La suppression des voyages en camion pour les étalons de trait
 - La diminution des risques de blessures (par les juments, par le camion)
- le nombre de juments par étalon peut être augmenté à volonté (suivant le nombre de doses possible par étalon), sans compliquer le suivi des juments.
- s'ils sont récoltables au vagin artificiel, des étalons (1) avec un mauvais comportement en monte naturelle (difficiles à la saillie), (2) ne pouvant plus faire la monte naturelle (fatigués, poussifs), (3) dangereux pour les juments (violents, verge trop longue) sont tout de même utilisés.
- les étalons hors monte peuvent produire des doses (IAC).
- on peut suivre la qualité de la semence pendant toute la saison de monte, les étalons qui sont indisponibles temporairement (carrière sportive) ou définitivement (mort de l'étalon) peuvent tout de même produire des poulains.
- l'exportation des doses et non de l'animal lui-même diminue les risques de blessures et les risques pour l'étalon et permet de garder un capital génétique.

2.3 Au niveau de la gestion des juments :

- Le suivi, pour les étalons très demandés nécessitait un suivi ovarien strict et un nombre de sauts limité; en IA, il peut se faire à la barre.
- Les femelles bimées à la saillie ou au poulinage, celles n'extériorisant pas leurs chaleurs ou n'acceptant pas la saillie peuvent être mises à la reproduction.

Introduction

- La synchronisation des chaleurs pour les juments inscrites au même étalon est utilisable , sans crainte de manquer de doses .

2.4 Au niveau génétique :

- Le choix des étalons offert à l'éleveur s'élargit : (1) en IAF pour les chevaux lourds si ceux-ci étaient auparavant en camion , (2) en IAC ou IAF transportée sur des longues distances pour les chevaux de sang .
- La semence disponible se rapproche des juments et diminue le transport d'animaux . Cette technique pourrait :
 - Permettre de connaître plus rapidement la qualité des nouveaux étalons en augmentant le nombre des poulains produits sur une période courte (2 ans) et en les testant rapidement
 - Augmenter la production d'étalons améliorateurs au détriment des étalons détériorateurs , par un nombre de cartes sensibles différent .
 - La fabrication des doses d'IAC permet la conservation du patrimoine génétique pour les races à effectif limité .
 - La production de mulets est simplifiée des problèmes des saillies entre les deux espèces (si l'on trouve des baudets récoltables facilement !)

2.5 Au niveau de la qualité technique :

La mise en place de l'IA s'accompagne d'une formation préalable sur la reproduction de l'étalon, de la jument , sur l'alimentation , sur la génétique ce qui est une incidence positive sur la gestion des haras concernés .

3. Les inconvénients :

3.1 Au niveau génétique :

- Le risque de consanguinité se pose si les étalons en IA font beaucoup plus de poulains que les autres étalons en produisant 10 fois plus qu'actuellement pour ressentir un faible effet sur la consanguinité de plus c'est le nombre total des poulains par carrière d'étalon qui influence sur les calculs de consanguinité et non le nombre des poulains par saison , ce qui est facile à régler si les généticiens nous donnent des règles .
- Les doutes sur la certification des origines sont levés par les deux mesures suivantes : identification de toutes les doses et contrôle de filiation obligatoire des poulains issus d'IA .

Introduction

3.2 Au niveau de cout :

- Pour son application, l'IA nécessite une technicité supérieure à la monte en main .
d'où un cout financier plus élevé en personnel qualifié et en matériel.

3.3 Au niveau technique :

La manipulation de la semence en dehors des voies génitales des reproducteurs augmente le risque d'atteinte de la fertilité :

- Il existe une grande variabilité individuelle entre étalon sur l'aptitude de la semence à être conservée. les différentes technique ne sont pas applicables à tous les étalons de sang seraient utilisables en sperme réfrigéré ; les 2/3 des étalons de sang congelables .
- La fertilité par chaleur en IAC est inférieur à celle de la monte en main ou de l'IAF .
- L'IAC demande un suivi ovarien intensif à cause de la limitation du nombre de doses .
- Un risque de mauvaise application des techniques est possible avec des répercussion soit sur le pouvoir fécondant de la semence , soit sur l'hygiène des doses et de leur mise en place .

Chapitre –I-
Anatomie de l'appareil reproducteur de la
jument

II. Anatomie de l'appareil génital de la jument :

Nous évoquerons l'anatomie de l'appareil génital de la jument. Il est le lieu de la production des gamètes et de la fécondation, et permet la nutrition de l'embryon au cours de la gestation ainsi que celle du jeune animal lors de la lactation. On distingue les portions glandulaire, tubulaire, urogénitale de l'appareil génital, et les mamelles. Nous aborderons également la placentation et les annexes fœtales.

1. Portion glandulaire :

La portion glandulaire de l'appareil génital de la jument est représentée par les ovaires, qui ont un fonctionnement cyclique.

1.1. Les ovaires :

Les ovaires sont des glandes paires appendues à la région lombaire, et présentant une double fonction de gamétogénèse et de sécrétion endocrine. Ils sont ovoïdes, de tailles importantes et variables (environ 5cm sur 8 cm) et se situent une dizaine de centimètres caudalement aux reins [1].

Leur rôle est double : assurer l'ovogenèse et la sécrétion endocrine , On distingue la face latérale de la face médiale, et le bord mésovarique du bord libre. Le bord mésovarique, sur lequel s'insère le mésovarium, est dorsal. Le bord libre est échancré par la fosse d'ovulation (figure 1) et est ventral. Le bord crânial de cette dernière donne attache à une fimbria ovarica [2].

L'ovaire est entouré d'une albuginée fibreuse blanchâtre, elle même recouverte du péritoine rendant les faces lisses, à l'exception de la fosse d'ovulation. La zone corticale, contenant les organites de l'ovaire, est interne alors que la zone médullaire, très vascularisée, est repoussée à l'extérieur [2].

Le maintien est assuré par le mésovarium, partie la plus crâniale du ligament large. Il est renforcé par le ligament suspenseur de l'ovaire, qui lie la paroi lombaire à l'extrémité tubaire de l'ovaire , Le ligament propre de l'ovaire s'étend de l'extrémité utérine de l'ovaire à l'extrémité correspondante de la corne utérine [2] .

Le dessin suivant illustre la conformation de l'ovaire de la jument :

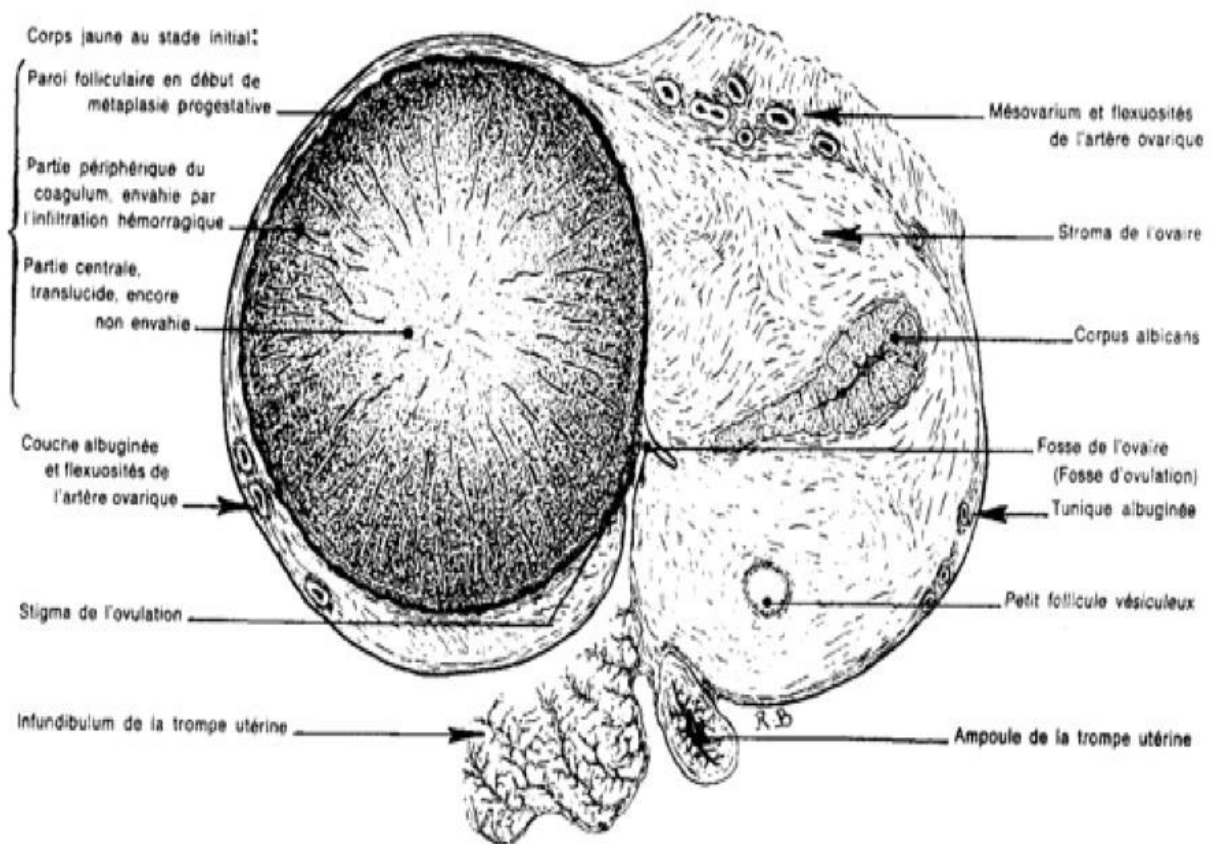


Figure 1 : Conformation de l'ovaire chez la jument. [3] .

2. Portion tubulaire :

La portion tubulaire forme les voies génitales. On distingue les trompes utérines, l'utérus et le vagin, Les trompes utérines.

Les trompes utérines sont très flexueuses et mesurent environ 30cm. A leur extrémité ovarienne se trouve l'infundibulum qui coiffe la fosse ovulatoire de l'ovaire. On trouve ensuite l'ampoule, puis l'isthme dont le diamètre diminue progressivement, et enfin le tubercule utérin avec l'ostium utérin de la trompe. La lumière est occupée par des plis tubulaires complexes. Le mésosalpinx contient les trompes et assure leur fixité. [2].

2.1. L'utérus :

L'utérus se situe dans la cavité abdominale, à l'exception du col (environ 6cm) qui est dans la cavité pelvienne. Il présente une taille et une morphologie variable en fonction du stade de la gestation. On distingue le corps, plutôt développé, des deux cornes, ce qui lui donne un aspect global en T ou en Y. En l'absence de gestation, les cornes et le corps de l'utérus sont de tailles équivalentes, soit environ 25cm en moyenne, même s'il existe des variations importantes entre femelles nullipares et multipares. [1].

Les cornes utérines présentent deux courbures : une grande convexe correspondant au bord libre, et une petite concave : le bord mésométrial. Leur apex est terminé en cul-de-sac et reçoit la trompe [2].

Le corps de l'utérus est légèrement aplati dorso-ventralement, et se poursuit à son extrémité caudale par le col de l'utérus, long d'environ 5cm [4].

La fixité de l'utérus est assurée par sa continuité avec le vagin, mais aussi par le ligament large. Ce dernier est fixé à la petite courbure des cornes et du corps d'une part, et à la région sous-lombaire et au côté de la cavité pelvienne d'autre part. En face latérale, il forme un repli secondaire nommé ligament rond [2].

Lors de la gestation, dès le 15ème jour post ovulation, l'utérus devient tubulaire et ferme. Au 21ème jour, la corne à la base de laquelle s'est implanté l'embryon s'élargit. Dès le 90ème jour de gestation, tout l'utérus est rempli par les liquides fœtaux, et il continue de se distendre, c'est pourquoi le plancher de l'utérus entre en contact avec la paroi abdominale, et la distinction entre le corps et les cornes de l'utérus est moins nette [4].

La muqueuse utérine est jaune-rosée, recouverte de mucus. Dans les cornes, elle est plissée en tous sens, alors que dans le corps elle est plissée longitudinalement, et que le fond de la cavité est lisse. La muqueuse du col est blanchâtre avec de nombreux plis longitudinaux [2].

2.2. Le vagin :

Le vagin mesure environ 25cm de long et se situe au centre de la cavité pelvienne, ventralement au rectum, et dorsalement à la vessie et à l'urètre.

Le corps du vagin est séparé de l'utérus par la partie vaginale du col de l'utérus, nommée fornix du vagin. La lumière vaginale est aplatie dorsoventralement, et présente une muqueuse rose avec des replis longitudinaux lui permettant de se dilater [1].

Le maintien du vagin est réalisé par le biais du péritoine, qui recouvre la partie crâniale, et du tissu conjonctif rétropéritonéal qui entoure la partie caudale [2].

Le dessin suivant permet de comprendre comment s'articulent les différentes parties de l'appareil génital de la jument que nous venons d'évoquer.

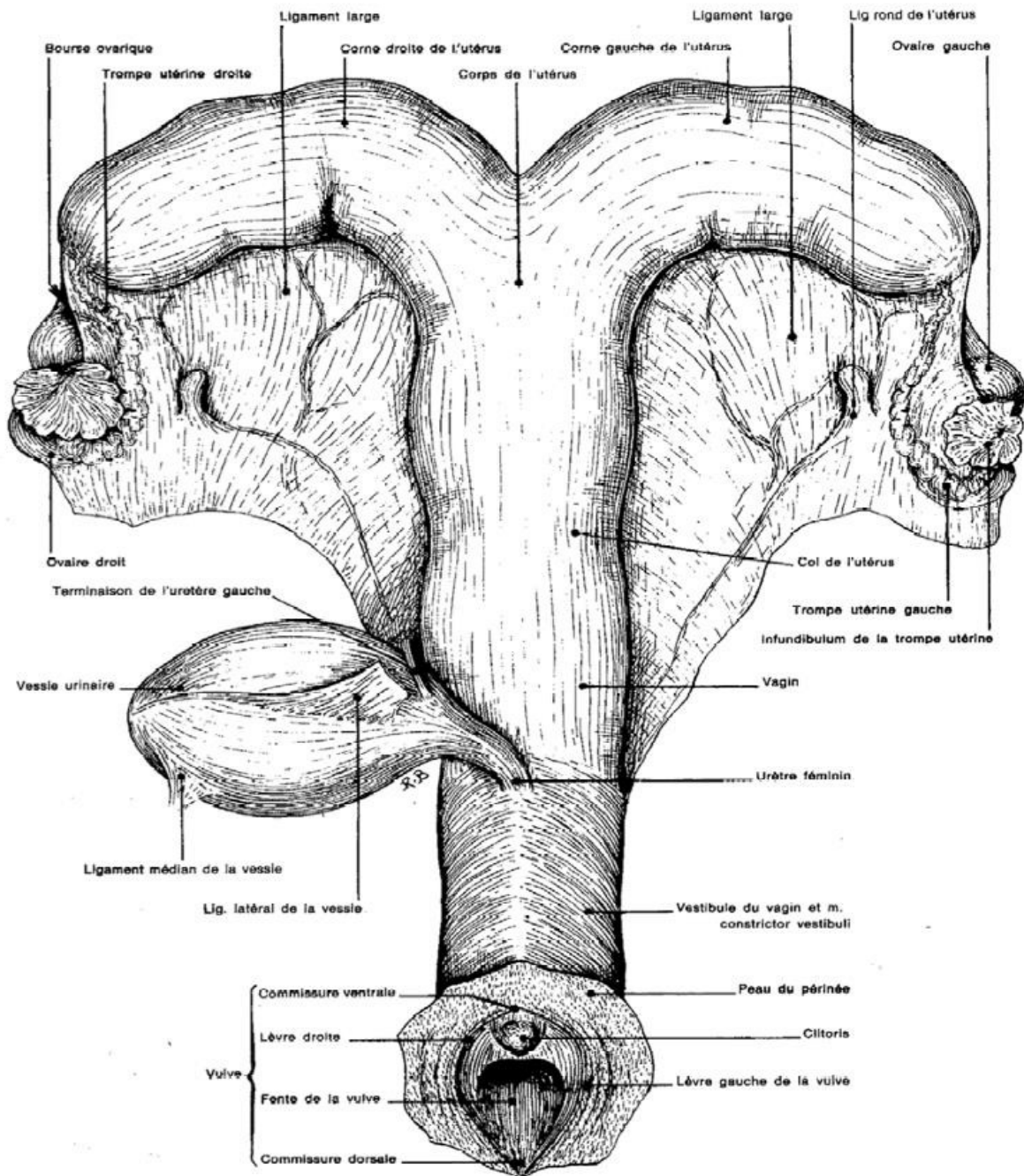


Figure 2 : Appareil génital d'une jument. Vue ventrale après isolement et étalement. [3].

3. Portion uro-génitale :

La portion uro-génitale est formée du vestibule du vagin et de la vulve, orifice externe de l'appareil génital femelle.

3.1. Le vestibule du vagin :

Le vestibule du vagin, s'étend de la vulve à l'anneau vestibulaire, lui même situé juste caudalement à l'abouchement de l'urètre. Il constitue la deuxième barrière de protection contre l'air et les déjections. L'hymen, ou un résidu de celui ci peut également être présent à ce niveau [4].

3.2 .La vulve et le périnée :

Le périnée comprend les tissus entourant l'anus et la vulve, et s'étend jusqu'à la partie ventrale de la queue. Il est le siège de fréquentes lésions lors du part. L'anus doit être dor- sal à la vulve et à sa verticale, de telle sorte que lors de la défécation, les crottins ne la souillent pas. La position de l'anus varie avec l'état d'embonpoint de la jument : il apparaîtra plus enfoncé si la jument maigrit [4].

La vulve est formée de deux lèvres s'apposant fermement pour recouvrir la fente vulvaire, longue de 12 à 15cm, qui doit être droite et verticale. Il s'agit de la première barrière mécanique qui s'oppose à l'entrée d'air ou de souillures dans le tractus génital [5].

Dorsalement, les lèvres forment une commissure triangulaire, alors que ventralement, elles forment une commissure arrondie recouvrant le clitoris. Ce dernier, bien développé chez la jument, est entouré de fosses clitoridiennes, latéralement et ventralement, alors que sa face dorsale présente trois petites dépressions nommées sinus clitoridiens [4].

Chapitre –II-
**Anatomie de l'appareil reproducteur
de l'étalon**

II . Anatomie de l'appareil reproducteur de l'étalon :

L'appareil génital mâle est divisé en trois parties qui possèdent des fonctions différentes , une portion glandulaire, à savoir les deux testicules dont le rôle est la formation des spermatozoïdes et l'élaboration des hormones mâles.une portion 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 portion 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 sécrétrices se terminent et qui joue un rôle dans la maturation des spermatozoïdes ; et l'urètre pénien qui aboutit au méat urinaire et auquel s'ajoutent des formations érectiles annexes volumineuses [12] .

1. portion glandulaire :

1.1. Les testicules :

Les testicules sont peu volumineux par rapport à la taille de l'animal (environ 200g, 10x6x5 cm). Ils sont doués d'une double fonction : la fonction germinale (la spermatogenèse) au niveau des tubes séminifères grâce aux cellules de Sertoli et la fonction endocrine, c'est-à- dire la synthèse d'hormones sexuelles par les cellules de Leydig [13].

1.2. Conformation intérieure et structure :

On retrouve un parenchyme, de couleur jaune-ocre chez le cheval, 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 [12, figure 3].

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 [12, figure 3].

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 (cellules endocrines sous forme d'îlots) [12, 13].

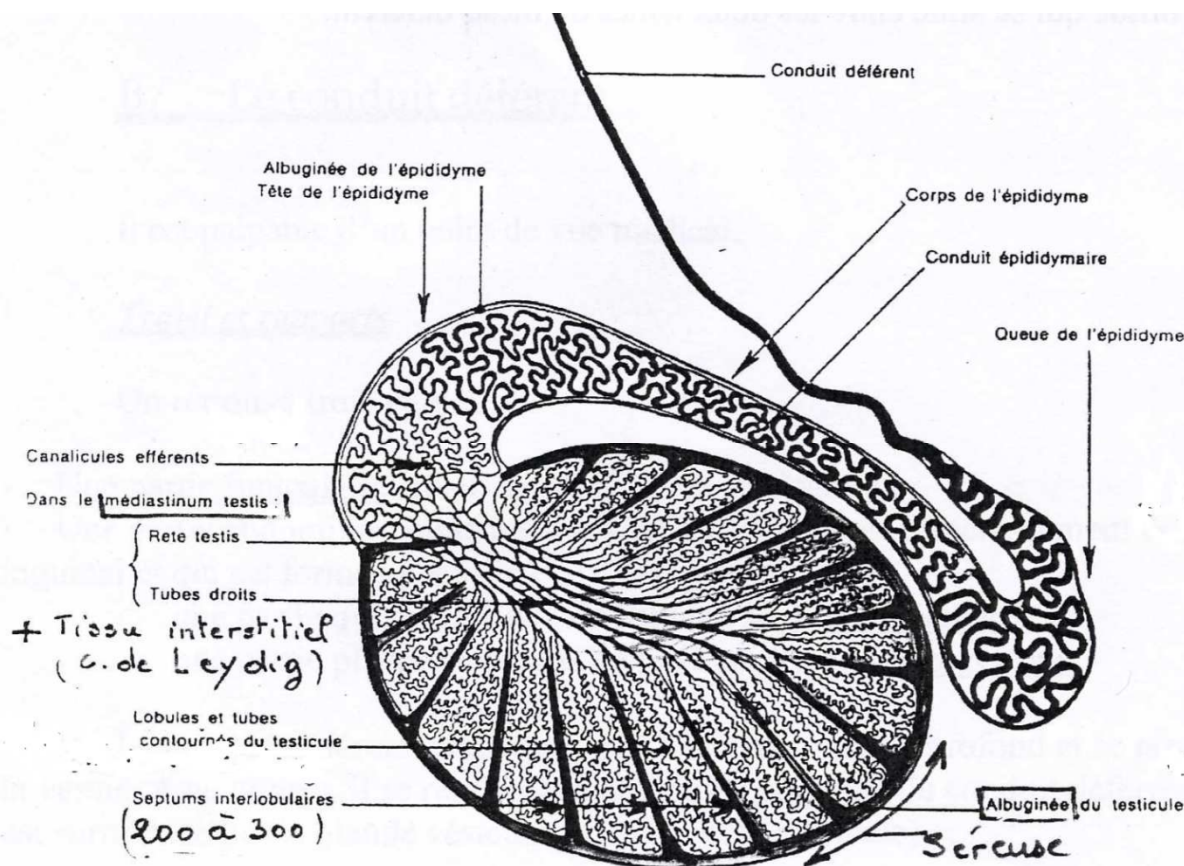


Figure 3 : coupe longitudinale d'un testicule et de l'épididyme d'un étalon [12].

2. portion tubulaire :

2.1. Les voies spermatiques intra-testiculaires :

Les voies de conduction spermatique testiculaires sont formées par les tubes droits prolongés par le rete 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 [12] :

- 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, l'exception d'amas de spermatozoïdes en cours de migration.
- Le rete 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

2.2. Les voies spermatiques extra-testiculaires :

2.2.1. L'épididyme :

La différenciation des gamètes mâles s'effectue dans le testicule. Cependant à leur sortie les spermatozoïdes ne sont pas matures : ils ne sont ni mobiles, ni féconds. La différenciation se poursuit en dehors de la gonade, dans le tube épидидymaire et constitue la maturation des spermatozoïdes. Dans cet organe, les spermatozoïdes continuent à se transformer en subissant plusieurs modifications notamment biochimiques, qui les rendront aptes à reconnaître et à féconder un ovocyte [13].

L'épididyme est un long canal de 80 mètres composé de trois parties : la tête, le corps, et la queue [figure 4]. Il relie les canaux efférents (à la sortie du testicule) au canal déférent au niveau de la jonction épидидymo-déférentielle. Le conduit déférent est palpable dans le cordon spermatique [12].

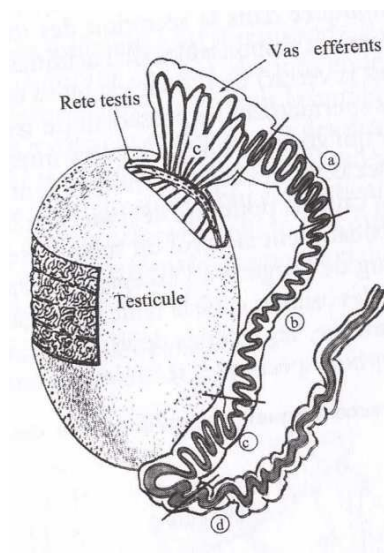


Figure 4 : schéma d'un épидидyme humain [13] : a = tête ; b = corps ; c+d = queue

L'épидидyme est composé d'une albuginée et de nombreux canaux commençant par une quinzaine de canalicules issus du *rete testis* qui forment la tête puis qui convergent en un conduit très sinueux, le conduit épидидymaire, qui devient ensuite plus épais et moins sinueux au niveau de la queue, formant par la suite le conduit déférent [12].

2.2.2. Le conduit déférent :

Le conduit déférent a un rôle de conduction des spermatozoïdes, qui migrent grâce à leur flagelle et aux contractions des fibres musculaires de la paroi. Ils sont ensuite stockés dans des

ampoules du conduit déférent, juste avant l'urètre.

Ce stockage ne doit pas être trop long car les spermatozoïdes perdent leur pouvoir fécondant en 72h. S'il n'y a pas d'éjaculation, ils dégénèrent et sont résorbés ou passent dans l'urine. S'il y a éjaculation, le canal déférent libère le sperme final, à savoir les spermatozoïdes, le fluide testiculaire et les sécrétions des glandes annexes [13].

Le conduit déférent est constitué de trois parties : une partie funiculaire (située dans le cordon spermatique), une partie abdomino-pelvienne (après l'interstice inguinal) et l'ampoule (au-dessus de la vessie) [12, figure 5].

2.2.3. L'urètre :

L'urètre pelvien débute au-delà du col de la vessie et se termine au dessus du col ischiatique. Il est composé d'une partie prostatique et d'une partie membranacée contenant un muscle sphincter. La prostate déverse son produit de sécrétion dans l'urètre pelvien via de nombreux petits conduits prostatiques. Les glandes de Cowper sont portées par l'urètre pelvien et présentent de nombreux abouchements [12, figure 5].

L'urètre pénien débute en regard de l'arcade ischiatique par un renflement et s'attache aux autres éléments érectiles. Il se situe au sein du corps spongieux [12].

3. Les glandes annexes de l'appareil génital male :

3.1. Les vésicules séminales :

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 autre 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 [12, 13, figure 5].

3.2. La prostate :

C'est une glande unique bilobée qui se situe sur le col de la vessie de part et d'autre de l'urètre. Dans chaque lobule, des glandes tubulo-alvéolaires de type séreux forment les éléments sécrétants. Leurs sécrétions sont déversées dans la lumière puis sont acheminées par des canaux dans l'urètre [12, figure 5].

Le liquide prostatique est riche en acides aminés et en enzymes (phosphatases alcalines et acides). Il permet 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 [13].

3.3. Les glandes de Cowper :

Elles déversent leur contenu au niveau de l'urètre membraneux. Le liquide qu'elles sécrètent est un liquide albumineux transparent. L'érection comprime les glandes de Cowper, favorisant ainsi l'élimination de leur contenu lors de l'éjaculation [12].

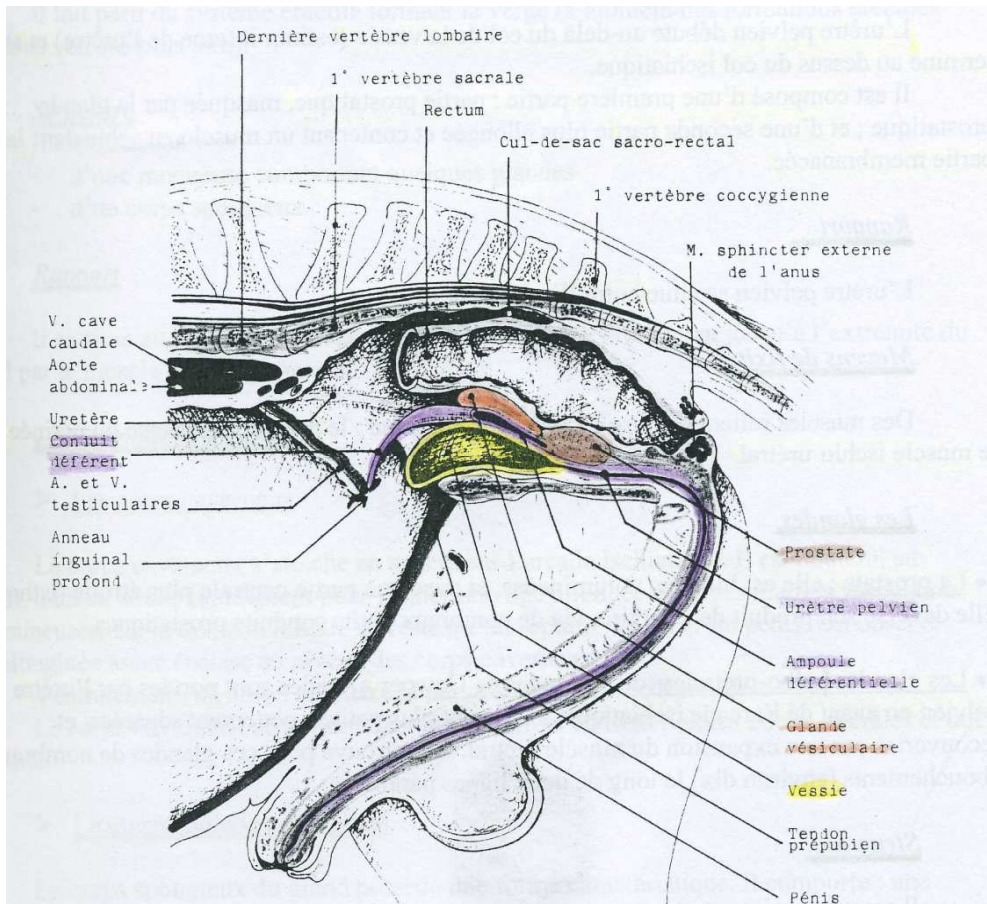


Figure 5 : coupe médiane de l'exploration rectale d'un étalon [12]

4. La partie libre du pénis :

La zone du périnée s'étend de l'anus aux enveloppes testiculaires. Le prépuce y fait suite et se termine par un ostium préputial. Le prépuce est un repli de peau en continuité avec la peau de l'abdomen qui entoure la partie libre du pénis. A l'intérieur on trouve une peau élastique, munie de nombreuses glandes prépucciales. Les tissus érectiles sont constitués de tissu conjonctif parcouru par un système de capillaires qui s'élargissent en lacunes et cavernes qu'un afflux de sang peut dilater, permettant ainsi l'érection. Ils sont situés dans le corps spongieux et dans le corps caverneux [12, 13, figure 6].

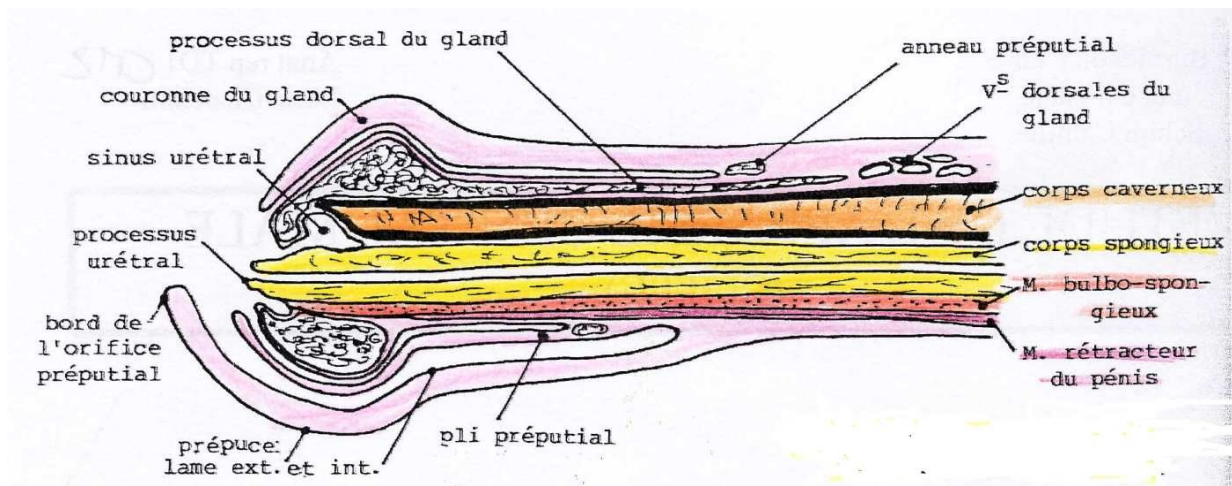


Figure 6 : coupe longitudinale de la partie libre du pénis [12]

Chapitre –III-

La récolte du sperme de l'étalon

III. La récolte du sperme de l'étalon :

Le prélevement de sperme est une phase essentielle lors d l'analyse de la semence. Il devra être fait dans meilleurs conditions de sécurité et d'efficacité avec comme objectif principal de ne pas détériorer la qualité de la semence [6] .

Avant toute récolte les étalons exploités en insémination artificielle (IA) doivent fournir un certificat vétérinaire de bonne santé, subir des contrôles (AIE, AVE, MCE) et être vaccinés contre la grippe et la rhino-pneumonie [7].

1. Le vagin artificiel :

Un vagin artificiel permet de récolter la semence de l'étalon dans des conditions optimales de temps et de sécurité. le principe d'un vagin artificiel est d'obtenir une « chambre » simulant les condition de température, de pression et de lubrification du vagin de la jument.

1.1 Choix du vagin artificiel :

Le choix du vagin artificiel et sa préparation conditionnent l'efficacité et la qualité de la semence récoltée de nombreux modèles de vagin artificiel sont disponible , et presentent des particularités qui sont privilégier selon les besoins spécifique de l'étalon , le mode de traitement de semence , et la préférence du manipulation . les paramètres àprendre en compte lors de l'achat d'un vagin artificiel sont le prix d'achat , le cout d'entretien et d'utilisation , la longévité , le poids , la capacité à garder la température adéquate pendant une durée plus ou moins longue et la qualité de sperme « perdu » à chaque récolte du fait de la configuration [6,Tableau1]. .

| | | |
|---|---|---|
|  |  |  |
| <p>Vagin de type Missouri</p> | <p>Vagin de type Japonais</p> | <p>Vagin de type Colorado ou INRA</p> |
| <p>Constitué d'un étui de cuir et d'un manchon formé d'une double paroi paroi délimitant la chambre à eau et raccordé à un cone en caoutchou sur lequel peut être fixé un flacon récupérateur .</p> <p>Avantage d'utilisation :</p> <ul style="list-style-type: none"> • pas cher à l'achat • léger • entrée d'air pour varier la pression • manipulations directes du pénis réduites | <p>Constitué d'un étui en aluminium , d'un manchon en caoutchouc , d'un sac de récupération de sperme , d'un pot isolant etourant ce dernier et un coussinet de rembourrage .</p> <p>Avantage d'utilisation :</p> <ul style="list-style-type: none"> • très léger (une main) • plus court donc plus de manipulations directes du pénis • valve pour contrôler la pression • pression plus grande possible | <p>Constitué d'un étui de plastique rigide , de deux manchon en caoutchouc formant la chambre à eau d'un flacon de récupération et d'une enveloppe protectrice .</p> <p>Avantage d'utilisation :</p> <ul style="list-style-type: none"> • bon maintien de la T° • robuste • sac pas cher • permet une éjaculation après le réservoir d'eau chaude |

Tableau 1: les différents types de vagins artificiels [8] .

1.2 Préparation du vagin artificiel :

Immédiatement avant le prélèvement de sperme , il convient de remplir la chambre à eau du vagin artificiel avec de l'eau à 45 – 50 °C , la pression à l'intérieur du vagin artificiel rempli d'eau doit être ajustée pour fournir un contact uniforme et étroit tout autour du pénis ,sans gêner la pénétration ou la dilatation de la verge à l'intérieur de l'instrument .

la totalité du pénis est introduit dans le vagin artificiel au moment de la première poussée copulatrice pour permettre au gland de se dilater à l'extrémité du vagin artificiel et éviter ainsi une éjaculation dans l'instrument qui entraînerait un contact prolongé de l'éjaculat avec les parois chaudes du manchon la température et la pression du vagin artificiel doivent être maintenues relativement constantes pendant le prélèvement pour obtenir un résultat optimal en termes de stimulation de l'éjaculation et de récupération de spermatozoïdes . les trois paramètres essentiels de la récolte de sperme sont donc le modèle de vagin , la température et le volume d'eau [6,8] .



Figure 7 : préparation d'un vagin artificiel de type Missouri (mise en place du manchon de protection à usage unique à l'intérieur et remplissage d'eau)

Avant le prélèvement , la surface interne du vagin artificiel est lubrifiée avec un lubrifiant stérile et non spermicide . le récipient de récupération du sperme est placé à température corporelle pendant la durée du prélèvement et de l'acheminement de l'échantillon jusqu'au laboratoire , ceci afin d'éviter d'éventuels chocs thermique . il est également préférable de protéger la semence de la lumière [6] .

Afin d'augmenter le nombre de spermatozoïdes récupérés et réellement utilisables à chaque prélèvement, un filtre à sperme est placé à l'entrée du récipient de récupération de l'éjaculat. Il permet 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. Les filtres en nylon sont plus

intéressants que les filtres en polyester car ils piègent moins les spermatozoïdes, Le filtre contenant le gel doit être retiré immédiatement du flacon pour éviter tout écoulement dans la partie spermatique [6, 8] .

2. Caractéristiques du mannequin :

Un mannequin permet d'inciter l'étalon à reproduire les gestes de l'accouplement. L'étalon va monter sur le mannequin comme il le ferait sur une jument puis le pénis est introduit dans le vagin artificiel afin de récolter le sperme au moment de l'éjaculation. Les différents éléments souhaitables au niveau d'un mannequin sont [6] :

- une hauteur réglable, avec une hauteur moyenne légèrement plus faible que la taille moyenne de la race des étalons prélevés
- une largeur et/ou un volume suffisants pour permettre à l'étalon d'agripper fermement le mannequin entre ses antérieurs (la largeur totale incluant le rembourrage conseillée est de 56 à 61 cm)
- un rembourrage adéquat avec une surface externe résistante, non abrasive et facilement nettoyable un pied central pour éviter des lésions des pieds ou des membres postérieurs de l'étalon au moment du prélèvement du sperme
- une installation dans un local avec une large surface dégagée de tout obstacle et avec à proximité un travail ou un endroit pour placer la jument souffleuse
- un sol non glissant et homogène



Figure 8 : mannequin de récolt .

3. La récolte du sperme :

3.1 La préparation de l'étalon pour la récolte :

3.1.1 Le lavage de la verge de l'étalon :

Sur un étalon mis en érection en présence d'une jument en chaleur il faut nettoyer le fourreau , la verge et la fosse urétrale [7] .

- Préparation d'un seau avec de l'eau tiède
- Mettre des gants
- Eviter de frotter la muqueuse de la verge risque d'irriter .
- Après lavage essuyer entre deux feuilles de papier absorbant .
- il faut jamais utiliser les antiseptique (meme dilué) pour le lavage de la muqueuse de la verge .
- Nettoyer la verge de bas en haut a l'aide de papier absorbant trempé dans le seau d'eau prévoir 3 feuilles de papier pour le lavage et 2 pour l'essuyage . il faut bien nettoyer les replis de la fosse urétrale . enlever tous eventuels bouchons de smégma située dans le replis de la fosse a l'aide de petit doigt



Figure 9 : : un seau d'eau tiède



Figure 10 : papier absorbant .



Figure 11 : lavage de la verge de l'étalon .

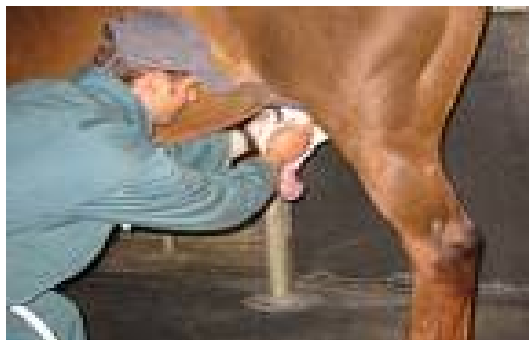


Figure 12 : séchage de la verge de l'étalon

3.2 La préparation de la jument pour la récolte :

La préparation de la jument repose sur la contention pour assuré une bonne protection des manipulateurs et de l'étalon . cette dernier se fait à l'aide d'un materiel de contention [7] .



Figure 13 : des entrave pour contention



Figure 14: Chausson de monte pour jument En feutre



Figure 15 : une jument entravée avant la récolte .

3.3 La récolte :

Losque le «récolteur » est prêt (vêtu d'une blouse propre , chaussures de sécurité aux pieds , vagin artificiel monté , vérifié et lubrifié , thermomètre retiré , gant à usage unique à la main gauche), l'étalon est amené dans le hangar de monte dès qu'il entre en érection et que celle-ci est complète l'étalonnier l'incite alors à chevaucher . dans le cas d'érection nerveux , la synchronisation entre le personnel de laboratoire et l'étalonnier est primordiale , pour éviter que l'étalon ne s'impatiente et qu'il produise trop de gel [9] .

Le « récolteur » qui partient à la droite de la jument ou du mannequin , s'approche alors sans geste brusque , oriente délicatement la verge de l'étalon à l'entrée du vagin artificiel . lorsque la verge de l'étalon pénètre à l'intérieur du vagin , celle-ci est alors légèrement inclinée vers le haut .

le vagin artificiel doit être maintenu en place mais pas trop fermement car il doit amortir les coups de reins donnés par l'étalon [9] .

Il est important de souligner que le « récolteur » doit , à ce moment là , éviter tout mouvement parasite des mains ou du vagin , dans le but de « forcer » l'éjaculation . en effet , le message sensitif qui sera envoyé ne correspondra pas à la sensation attendue par l'étalon . les mouvements de va et vient , de la main ou du vagin , pratiqués trop souvent par les mauvais « récolteurs » le long de la verge du cheval , ne correspondent jamais au rythme naturel d'un étalon saillissant , et provoquent à long terme un effet inverse à celui espéré , même si cela semble « marcher » une fois ou deux . le cheval doit saillir dans vagin artificiel comme il le ferait dans une jument . durant la saillie , une jument ne bouge jamais d'avant en arrière pour exciter l'étalon . en cas d'échec , penser plutôt à changer les paramètres du vagin artificiel pour procurer de nouvelles sensations à l'étalon [9] .

Lorsque le cheval éjaculé , le vagin est alors incliné délicatement et légèrement vers le bas pour que le sperme s'écoule dans le flacon [9] .

La présence de sperme dans le réceptacle est vérifiée à l'intérieur du laboratoire afin d'éviter les chocs thermiques [9] .

3.3.1 Problèmes liés à la récolte :

Dans certains cas , plusieurs sauts sont nécessaires à l'intérieur du vagin artificiel avant d'aboutir (ou non !) à l'éjaculation . le premier facteur à mettre en cause est le montage du vagin artificiel . il convient de vérifier , dans l'ordre [9] :

- la tension des parois .
- la température .
- la pression .
- la lubrification .

pour chaque cheval il sera intéressant de noter « ses particularités » de récolte (type de vagin , volume d'eau , température , usage ou non de capote à usage unique , habitudes comportementales , etc .) .

Chapitre –IV-
**Techniques générales de manipulation
de la semence :**

IV. Techniques générales de manipulation de la semence :

Immédiatement après le prélèvement, la semence est rapidement transportée au laboratoire pour réduire les risques d'altération liée à l'action de la lumière ou à un choc thermique (température ambiante trop froide ou trop chaude). Tout le matériel entrant en contact avec la semence, ainsi que les milieux de dilutions, doivent être préalablement chauffés à température corporelle (figure 14) . Lorsqu'il n'y a pas de filtre de semence placé lors du prélèvement au niveau de l'entrée du récipient de recueil une filtration de l'échantillon au travers d'un filtre non toxique doit être immédiatement réalisée, afin d'éliminer le gel et les débris. La partie gélatineuse du sperme peut également être éliminée par aspiration avec une seringue mais la perte en spermatozoïdes est alors en général plus importante [4] .



Figure 16 : cuve pour bain-marie contenant le milieu de dilution et les récipients allant accueillir le sperme, à température corporelle (36.8°C)

La concentration en spermatozoïdes, le volume, la couleur de la fraction sans gel de l'éjaculat et le pourcentage de spermatozoïdes mobiles progressifs sont ensuite déterminés. L'ensemble des caractéristiques de l'éjaculat est enregistré sur des fiches d'évaluation de l'éjaculat qui sont archivées ou stockées sous forme de fichiers informatiques. Le sperme est dilué dans un milieu adapté quelques minutes après la récolte afin de maintenir au maximum la viabilité des spermatozoïdes. Si la semence n'est pas stockée plus de une ou deux heures à la température du laboratoire et à l'abri de la lumière), une dilution de un volume de sperme pour un ou deux volumes de dilueur est en général correcte.

Il est également possible de placer le dilueur chauffé à 37°C directement dans le flacon de récolte fixé au vagin artificiel pour assurer une protection et des éléments nutritifs aux spermatozoïdes dès l'éjaculation.

Cette méthode est rarement nécessaire, excepté pour quelques étalons dont le plasma séminal semble réduire la mobilité et la durée de survie des spermatozoïdes [6,8] .

Pour mesurer de manière fiable la concentration de l'échantillon, le dilueur utilisé doit être transparent si la mesure est faite à l'aide d'un spectrophotomètre ou d'un densimètre. Sinon la mesure est soit effectuée manuellement à l'aide d'une cellule hématimétrique, soit déterminée à partir d'une goutte de sperme frais non dilué [6,8] .

Les dilueurs de semence augmentent la durée de survie des spermatozoïdes et sont le plus souvent à base de lactose ou de lait. L'ajout d'antibiotiques favorise l'élimination des bactéries qui contaminent de manière systématique les échantillons de sperme au moment du prélèvement. Les antibiotiques les plus couramment employés sont le sulfate de polymixine B (concentration de 200 à 1000 UI/mL), la pénicilline cristalline (100 à 1500 UI/mL), le sulfate de gentamicine (100 à 1000 µg/mL), le sulfate d'amikacine (100 à 1000 µg/mL) et la ticarcilline (100 à 1000 µg/mL). Lorsque la gentamicine ou l'amikacine sont utilisées, il faut ajouter dans le dilueur du bicarbonate sodique afin d'ajuster le pH du milieu. Un pH variant entre 6,6 et 7,2 est optimal pour conserver la mobilité des spermatozoïdes tout en évitant une capacitation prématurée. L'association pénicilline G potassium (1000 UI/mL) et sulfate d'amikacine (1000 µg/mL) dans un dilueur à base de lait conserve la mobilité des spermatozoïdes dans des conditions optimales tout en offrant une activité antibactérienne à large spectre [6] .

1. Evaluation macroscopique de la semence :

L'évaluation de la semence doit être réalisée de manière méthodique et minutieuse par une personne expérimentée et dans un laboratoire correctement équipé.

Le volume de la fraction sans gel, la couleur et l'aspect macroscopique sont notés (figure6) . La mesure du volume est utile pour calculer le nombre total de spermatozoïdes contenus dans l'éjaculat et se fait généralement à l'aide d'une éprouvette graduée de 100 ml.

Le volume de l'éjaculat varie en fonction de la saison (plus faible en hiver qu'en été) et en fonction du temps de préparation de l'étalon (une stimulation sexuelle prolongée augmente le volume sans modifier le nombre de spermatozoïdes).

L'évaluation macroscopique de l'aspect et de la couleur de l'éjaculat permet de détecter la présence éventuelle de sang, d'urine ou de pus dans l'éjaculat [6,8] .

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. Un pH supérieur à 7,7 indique souvent une infection ou une inflammation de l'appareil génital interne, une contamination par de l'urine ou un autre produit alcalin tel que le savon ou une éjaculation incomplète. Le pH peut également être affecté par la méthode de récolte et par le type de lubrifiant éventuellement utilisé. Les changements de pH et d'osmolarité provoqués par l'urospermie ont un effet négatif sur la mobilité des spermatozoïdes [6,8] .

2. Détermination de la concentration en spermatozoïdes :

La mesure de la concentration en spermatozoïdes de l'échantillon permet de calculer le nombre total de spermatozoïdes de l'éjaculat. Elle se réalise selon trois techniques principales :

La cellule hématimétrique, le spectrophotomètre et le compteur électronique de particules [6,8] .

2.1 Utilisation de la cellule hématimétrique :

Il s'agit de la méthode la moins chère pour déterminer la concentration en spermatozoïdes de l'éjaculat et consiste en un comptage direct des spermatozoïdes observés individuellement. L'utilisation de la cellule hématimétrique (cellule de Thoma (figure 15) ou cellule de Malassez) est assez fiable lorsque la dilution (en général au 1/100ème) est faite de façon précise à l'aide d'une pipette de dilution pour le comptage des leucocytes et des plaquettes (l'Unopette system®).

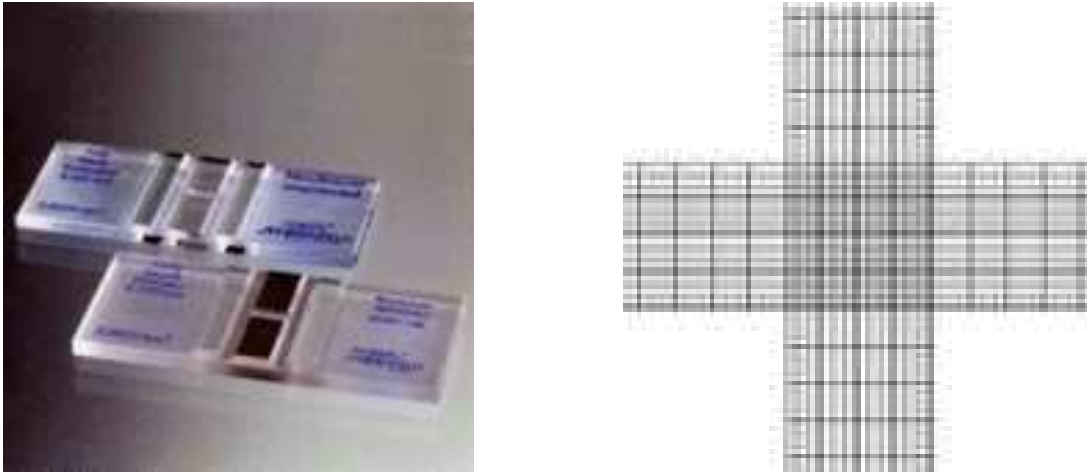


Figure 17 : cellules de Thoma (d'après les laboratoires Fiers) : les spermatozoïdes présents dans les grands carrés sont comptés.

Les étapes de la préparation sont les suivantes [6,8] :

Après avoir bien agité l'échantillon, le sperme est aspiré par capillarité jusqu'à la graduation 1.

La pipette est ensuite remplie jusqu'à la graduation 100 avec une solution formolée.

La semence ainsi diluée est mélangée en retournant la pipette puis placée au niveau des deux chambres des cellules de Toma (après avoir éliminé les cinq premières gouttes). La lame est laissée à sédimenter pendant 5 à 10 minutes avant de commencer le comptage.

La concentration est calculée à partir du nombre de spermatozoïdes comptés dans les carrés de la cellule (figure 16) ; seuls les spermatozoïdes dont la tête se trouve à l'intérieur des carrés sont comptés. Il est parfois nécessaire de varier le taux de dilution pour faciliter le comptage, en l'augmentant à 1/200ème pour les éjaculats très concentrés ou en le diminuant à 1/50ème pour les éjaculats très dilués. Il est préférable de faire un comptage dans un carré de chaque côté de la chambre de la cellule hématimétrique et de calculer la moyenne des deux, puis de multiplier ce nombre par un million pour connaître le nombre de spermatozoïdes par millilitre. Si ces deux comptages sont très différents, il est conseillé de reprendre toute la procédure depuis la dilution dans la pipette et de refaire le comptage. De nombreux laboratoires réalisent leurs comptages sur un nombre bien plus important de carrés, afin d'avoir une mesure plus juste.

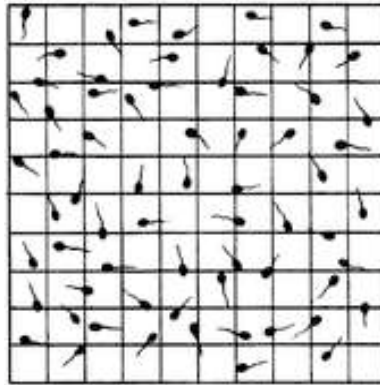


Figure 18 : l'observation des spermatozoïdes sur une cellule de Thoma (d'après Milian Swiss) .

2.2 Utilisation du spectrophotomètre :

L'acquisition d'un spectrophotomètre (figure17) est justifiée pour les praticiens spécialisés ou les grands haras, surtout quand l'insémination artificielle est utilisée. Cette technique est basée sur la corrélation entre la densité optique d'un échantillon de sperme dilué et sa concentration.

Les spectrophotomètres peuvent être plus ou moins sophistiqués et doivent être calibrés pour le sperme d'étalon. La courbe standard est généralement établie à l'aide de dilutions sériées d'un échantillon donné dont la concentration est calculée à l'aide d'une cellule hématimétrique.

L'appareil est calibré pour une utilisation avec une lumière d'une longueur d'onde de 550 nm. Un réétalonnage régulier des appareils est nécessaire, 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 [6,8] .

3. Détermination du nombre total de spermatozoïdes par éjaculat :



Figure 19 : photomètre AccuRead®(d'après IMV technologies) .

Le nombre total de spermatozoïdes de l'éjaculat, calculé en multipliant son volume par la concentration, est un paramètre important pour évaluer la fertilité d'un étalon. Il est soumis à des variations saisonnières, mais dépend également de nombreux facteurs tels que la fréquence des prélèvements et donc des éjaculations, l'âge, la taille des testicules, le rendement de la fonction de spermatogenèse (c'est-à-dire la quantité de spermatozoïdes produits par unité de poids de testicule), la quantité de spermatozoïdes contenus dans le réservoir extragonadique que constitue la queue de l'épididyme, et les différentes affections génitales possibles. Le nombre total de spermatozoïdes dans un éjaculat d'un étalon mature est en général compris entre 4 et 12 milliards. Chez les étalons pour lesquels un faible nombre de spermatozoïdes est dénombré dans l'éjaculat, il est conseillé de chercher à évaluer la production spermatique journalière (DSO ou « Daily Sperm Output »). Pour cela, un prélèvement de sperme quotidien est réalisé pendant 7 à 10 jours de suite avec une mesure du nombre total de spermatozoïdes dans chacun des éjaculats. Une fois que la réserve extragonadique en spermatozoïdes s'est stabilisée (4 jours pour les étalons ayant de petits testicules et 5 à 6 jours pour ceux ayant de gros testicules), il est possible d'estimer la DSO en faisant la moyenne du nombre de spermatozoïdes des éjaculats recueillis pendant 3 jours consécutifs. Lors d'une utilisation régulière comme reproducteur, l'étalon devrait ainsi pouvoir éjaculer chaque jour ce nombre de spermatozoïdes. Cette production quotidienne de spermatozoïdes par les testicules varie en fonction de la saison, de l'âge, de la taille des testicules, et de la présence ou non de troubles de la fonction testiculaire [6,8] .

4. Evaluation de la mobilité des spermatozoïdes :

L'évaluation de la mobilité et de la morphologie des spermatozoïdes est une étape indispensable lors de l'examen de la semence. La mobilité des spermatozoïdes reflète généralement la viabilité de l'ensemble des spermatozoïdes d'un éjaculat et une corrélation positive (mais non absolue) existe entre la mobilité et la fertilité (figure18) .

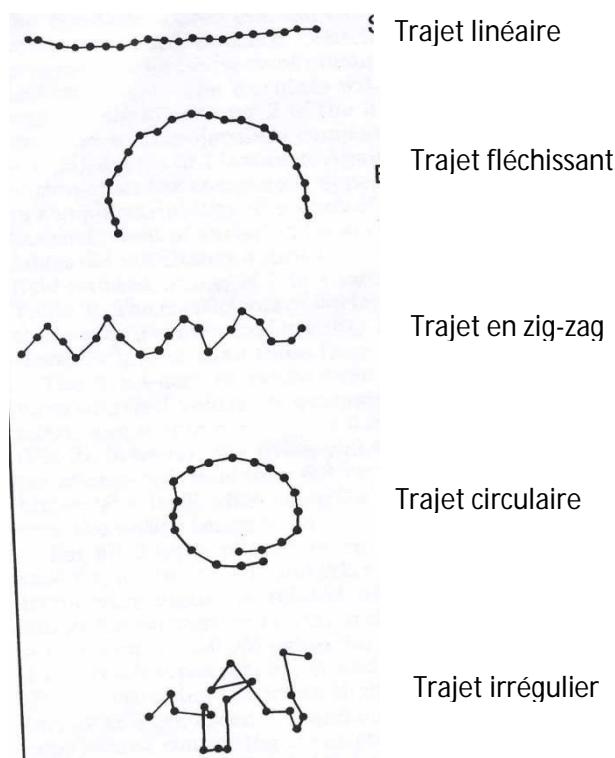


Figure 20 : photomètre AccuRead®(d'après IMV technologies) .

4.1 Méthode classique :

4.1.1 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 (tableau2) . La fiabilité et la répétabilité de cette évaluation sont ainsi généralement nettement améliorées.

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 [6,8] .

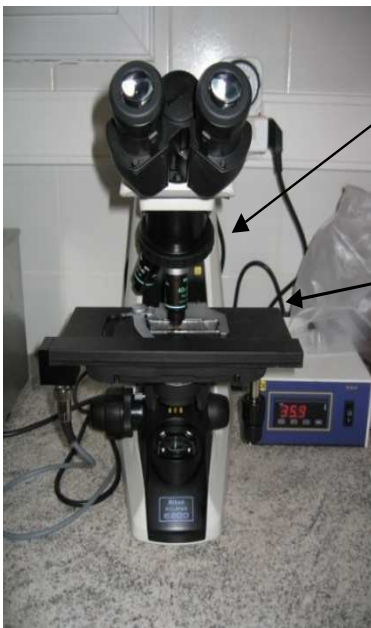
| Noms | Composition |
|------------------------|--|
| Dilueur INRA 96 | Le milieu INRA96 est composé d'une solution de sels et de sucres ainsi que de la fraction purifiée des caséines du lait ou PPCN (phosphocaséinate natif). Ce milieu contient des antibiotiques aux concentrations habituellement utilisées (cf. Guide Pratique d'Insémination Artificielle Equine) c'est-à-dire 50UI/mL de pénicilline et 50µg/mL de gentamicine ; de plus il contient un antifongique, l'amphotéricine B (0,25µg/mL) (Batellier et al., 1997). |
| Dilueur de Kenney | Mélanger du lait écrémé en poudre (2,4 g) avec du glucose (4,9 g) dans 92 mL d'eau déminéralisée. Ajouter de la pénicilline G cristalline (150 000 UI) et du sulfate de streptomycine cristallin (150 000 µg) ou du sulfate de gentamicine (100mg) mélangé dans 2 mL d'une solution de bicarbonate de sodium à 7,5%. |
| Dilueur au lait écrémé | Chauffer 100 mL de lait écrémé non supplémenté à 92-95°C pendant 10 minutes au bain-marie, Refroidir. Ajouter du sulfate de polymyxine B (100 000 UI). PS : aux Etats-Unis il n'y a pas de lait UHT d'où cette préparation ; en France le lait UHT demi-écrémé est fréquemment employé |
| Dilueur « crem-gel » | Dissoudre 1,3 g de gélatine non parfumée dans 10 mL d'eau stérile déminéralisée. Stériliser. Chauffer un mélange moitié crème moitié lait à 92-95°C pendant 2 à 4 minutes au bain-marie. Enlever l'écume en surface. Mélanger 10 mL de la solution de gélatine avec 90 mL de la préparation lait- crème. Refroidir. Ajouter de la pénicilline G cristalline (100 000 UI) et du sulfate de streptomycine (100 000 µg) et du sulfate de polymyxine B (20 000 UI). |

Tableau 2: description des dilueurs de semence couramment employés [8]

4.2 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 (figure 19) et comporte une estimation de [6,8] .

la mobilité totale, à savoir le pourcentage de spermatozoïdes mobiles du pourcentage de spermatozoïdes fléchants, à savoir de spermatozoïdes présentant une trajectoire linéaire rapide la vitesse des spermatozoïdes : une note est attribuée (0=immobiles à 4=rapides) 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 [6,8] .



Microscope à contraste de phase .

Microscope plaque chauffante

Moteur permettant la chauffe
de la plaque, avec une sélection
de la T°

**Figure 21 : microscope à plaque
chauffante**

5. Conservation de la semence :

La mobilité peut être affectée par des conditions environnementales défavorables (températures excessives, lubrifiants, désinfectants, osmolarité ou pH de la solution de dilution). Il est donc indispensable de protéger la semence de ces conditions extérieures avant l'analyse. L'évaluation de la conservation de la mobilité se fait sur plusieurs échantillons dilués à 20 millions de spermatozoïdes par millilitre conservés à température ambiante (20-25°C) et réfrigérés (4-6°C). La conservation de la mobilité est améliorée dans la durée pour le sperme réfrigéré.

Le « Manuel d'évaluation de la qualité du sperme d'étalon » publié par la Société de Theriogenology [10] .

considère qu'un échantillon de sperme conservé à l'abri de la lumière, à température ambiante pendant 6 heures s'il est « pur » ou pendant 24 heures s'il est « dilué », doit avoir une mobilité minimale de 10% [6,8] .

Chapitre –V-
Téchniques d'insémination artificielle

V. Techniques d'insémination artificielle :

1. La nature de la semence et les traitements subis :

L'insemination artificiel classique peut se faire avec trois types de semence [7] :

- IA immédiate : la mise en place (IA) a lieu sans réfrigération, dans l'heure qui suit la récolte.
- IA 12 heures : la semence est réfrigérée et utilisée dans la journée.
- IA 24 heures : la semence est réfrigérée et utilisée le lendemain de la récolte.
- IA congelée : la semence est congelée avant l'insémination.

Comme le montre le tableau ci-dessous, à chaque technique correspond un dilueur, un conditionnement, une vitesse de réfrigération et une température de conservation adaptés.

| | IA immédiate | IA 12 heures ou IA 24 heure | IA congelée |
|---|---------------------|--|--|
| Dilueur utilisé | lait ½ écrémé | lait ½ écrémé, Kenney, INRA 82, INRA 96 | INRA 82 + 2 % jaune d'œuf + 2,5 % glycérol, INRA freeze |
| Antibiotiques | sans | oui | oui |
| Conditionnement | seringues | tubes ou seringues | paillettes ou pailles |
| Nb minimum de spermatozoïdes par dose IA | 200 millions | 200 millions | 400 millions |
| Nb de doses d'IA | 25 | 25 | environ 12 |
| Produites par récolte en moyenne | | | |
| Température de conservation | 22° C | 4° C | - 196 ° C (azote liquide) |
| Délai d'utilisation | 1 heure. | 24 heures max. | indéterminé |

Tableau 3 : les différents type de semence utiliser dans insémination artificiel chez la jument

Recommandation :

[7] .

- Lorsque l'étalon utilisé a une semence de qualité "inférieure", le nombre de spermatozoïdes par dose doit être augmenté, le nombre de juments pouvant être servies par récolte étant par conséquent diminué .
- Plus l'IA est différée de la récolte dans le temps (ce qui implique la réfrigération ou la congélation), plus la fertilité diminue et plus le coût de fabrication d'une dose d'IA augmente.

2. Suivi des jument :

[7] .

Les juments sélectionnées sont suivies par échographie et palpation trans-rectale un jour sur deux , jusqu'à ce qu'elles présentent des follicules de plus de 30 mm de diamètre Elles sont alors suivies quotidiennement . quand un follicule atteint 35 mm , l'ovulation est provoquée par une injection par voie sous-cutanée de 1500 à 2500 U.I d'HCG .

L'ovulation survient dans les 40 H suivant cette injection . les juments sont alors échographiées tous les jours , voire deux fois par jour , pour suivre l'évolution du follicule mur . l'insémination a lieu en période pré ou post-ovulatoire , en viron 36 H après l'administration d'HCG .

3. Préparation de la jument :

[7] .

- Mettre la jument dans la barre d'insémination ou l'entraver.
- Mettre un protège-queue ou une bande de queue à usage unique. Attacher la queue.

3.1 Lavage de la jument :**3.1.1 A la douchette :**

[7] .

- mettre 1 gant à usage unique.
- 1er lavage : arroser la vulve de la jument à l'eau (tiède si possible); mettre un savon antiseptique(par exemple: Vétédine SavonND) sur le gant. Laver la vulve de haut en bas, puis les côtés de la vulve, le dessous du clitoris et terminer par l'anus et la base de la queue.

Recommandation :

[7] .

- ✓ Attention à ne pas introduire de l'eau savonneuse à l'intérieur du vagin en appuyant trop fort sur la vulve. Ne jamais revenir sur la vulve après avoir nettoyé la région alentour.
- ✓ Arroser abondamment à l'eau le gant qui a servi à laver la vulve jusqu'à ce que l'eau qui s'écoule soit claire puis rincer la région vulvaire.



Figure 22: lavage a la douchette .

3.1.2 Au seau :

[7] .

- mettre 2 gants à usage unique.
- mettre suffisamment de papier à usage unique (6 feuilles) dans un seau d'eau et réserver la main gauche pour prendre ce papier dans le seau afin que cette main soit toujours propre et ne souille pas l'eau. Effectuer le 1er lavage de la jument (avec la main droite). Avec la main gauche, faire écouler l'eau du papier absorbant sur le gant de la main droite pour le rincer (se positionner à côté du seau). Mouiller à nouveau le papier, le prendre dans la main droite afin de rincer la vulve.
- recommencer un 2ème lavage, puis un 2ème rinçage, puis un 3ème lavage et enfin un 3ème rinçage. Ne pas laver l'anus, ni la base de la queue lors du 3ème lavage afin de ne pas souiller la vulve avec les eaux d'écoulement.

3.2 Séchage :

[7] .

Prendre une feuille de papier absorbant sec et essuyer la vulve, puis les côtés de la vulve, puis le dessous et enfin l'anus et la base de la queue. La feuille de papier absorbant doit être propre à la fin de l'essuyage. Ne pas oublier d'essuyer les gouttes présentes sur la poche de queue .



Figure 23: séchage de la vulve.

Recommandation :

[7] .

- ✓ Afin de préserver l'appareil génital de la jument, il est important de veiller à ne pas y introduire de germes externes. Dans ce but ce protocole de lavage-rinçage-séchage doit être respecté.

4. Préparation du cathéter :

[7] .

Le cathéter et son extrémité souple pour fixer la seringue ont un volume intérieur de 4,8 ml. Pour pousser toute la dose de sperme à l'extérieur du cathéter, il faut prévoir dans la seringue un volume d'air de 6 ml correspondant à l'air qui restera dans le cathéter + un résidu de sécurité pour comprimer l'air et pousser tout le liquide hors du cathéter. Au cours de ces manipulations, la dose d'I.A. ne doit rentrer en contact qu'avec du matériel stérile.

5. Dose en tube :

[7] .

- Découper aux ciseaux l'enveloppe du cathéter d'I.A. du côté « embout seringue ». Laisser le cathéter d'I.A. dans son enveloppe de transport.
- Ouvrir l'enveloppe de la seringue en séparant les deux feuillets, la sortir de son étui. Aspirer 2 ml d'air et la monter sur le cathéter d'I.A. resté dans son enveloppe.
- Prendre un gant stérile ou un gant à usage unique en le retournant pour l'enfiler. Veiller à ce que la face externe ne touche à rien jusqu'à la pénétration dans le vagin.

- Sortir le cathéter de son enveloppe. Une fois sorti de cette enveloppe, il ne doit toucher à aucun objet, hormis l'intérieur du tube stérile contenant la dose d'insémination ou le gant stérile de l'inséminateur.
- Remonter la gaine sanitaire à l'aide du gant stérile sur une dizaine de centimètres, introduire le cathéter dans le tube contenant la dose. Aspirer toute la dose et un peu d'air sur les 10 derniers centimètres du cathéter (afin d'éviter de perdre de la semence par simple gravité lorsque l'on retire le cathéter du tube).
- Remettre la gaine sanitaire sur l'extrémité du cathéter. La dose est prête.

6. Dose en seringue :

[7] .

- Découper aux ciseaux l'enveloppe du cathéter d'I.A. du côté « embout seringue ». Laisser le cathéter d'I.A. dans son enveloppe de transport.
- Sortir la dose. Monter la seringue sur l'embout du cathéter et aspirer 6 ml d'air.
- Prendre un gant stérile ou un gant à usage unique en le retournant pour l'enfiler. Veiller à ce que la face externe ne touche à rien jusqu'à la pénétration dans le vagin.
- Sortir le cathéter de son enveloppe. Repousser la semence dans le cathéter jusqu'à une dizaine de centimètres de l'extrémité et remettre la gaine sanitaire sur l'extrémité du cathéter.



Figure 24: Dose en seringue .

7. Insémination proprement dite :

[7] .

Il s'agit d'apporter la dose de sperme jusque dans l'utérus et sans y apporter les germes de la vulve ou du vagin.

- Protéger l'ensemble extrémité du cathéter-gaine sanitaire en la plaçant dans le creux formé par la paume de la main et les 3 doigts opposés au pouce et à l'index qui se rabattent sur le cathéter.
- Mettre 2 ou 3 giclées d'huile sur le dos de la main et en lubrifier les lèvres de la vulve. L'index destiné à être introduit dans le col ne doit pas être lubrifié et doit toucher la vulve le moins possible. Introduire l'ensemble main-gaine-cathéter jusqu'au fond du vagin. Retenir la gaine à l'entrée du col. Dégager l'index et l'introduire dans le col. Faire progresser le cathéter en dessous de l'index, puis devant en l'orientant vers le bas. Le cathéter pénètre dans l'utérus sur une longueur d'environ 10 cm.
- Mettre la seringue en position verticale. Pousser doucement la dose.
- Retirer l'ensemble gant + cathéter. Placer le cathéter dans le gant retourné et jeter l'ensemble. Détacher la queue, enlever le protège-queue.

Recommandation :

[7] .

- ✓ N'inséminer que des juments en chaleurs. Ne pas se contenter de l'état du col pour estimer l'œstrus . mais effectuer un passage à la barre systématique avant chaque insémination.



Figure 25: l'insémination artificiel chez une jument .

8. l'insémination artificielle profonde :

[7]

L'IA profonde permet de déposer le sperme en haut de la corne de l'utérus, du côté du follicule pré ovulatoire. Le lieu de stockage des spermatozoïdes se trouve dans les oviductes, juste au-dessus de l'extrémité des cornes de l'utérus.

Elle se pratique :

- . soit en aveugle (lors d'une IA normale, le cathéter portant une bille à son extrémité est poussé au bout de la corne utérine choisie en s'aidant par voie rectale),
- . soit avec un endoscope (après avoir insufflé de l'air dans l'utérus, la tige de l'endoscope est poussée jusqu'en haut de la corne utérine, à l'endroit de l'ouverture de l'oviducte, 1 seule IA est possible par cycle).

L'IA profonde est proposée quand l'offre de spermatozoïdes est réduite en nombre de paillettes, sans que ces techniques aient été évaluées en comparaison des techniques standard sur un grand nombre de juments.

Un suivi très strict des juments (souvent 2 échographies par jour ou plus) est nécessaire. Ces techniques ne peuvent être pratiquées que dans des centres très spécialisés.

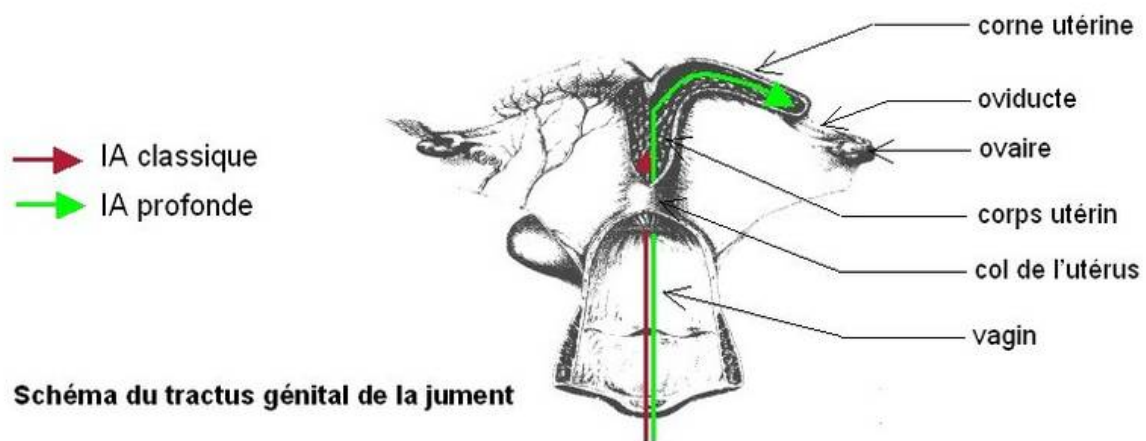


Figure 26 : insemination profonde

Risque de la technique :

[7]

Plus le nombre de spermatozoïdes inséminés est éloigné de 400 millions, plus on prend le risque de diminuer la fertilité.

Un suivi beaucoup plus long et complexe associé à l'IA profonde ne rattrapera pas forcément cette chute et la jument risque d'être vide en fin de saison avec des coûts techniques très élevés.

Les techniques d'IA profonde comportent des risques sanitaires et de contention pour la jument.

Recommandation :

[7]

Comme il n'y a actuellement aucune réglementation régissant la vente des doses de spermecongelé équin sur les aspects de qualité et de quantité de spermatozoïdes, le sperme congelé ne doit pas s'acheter à la légère.

Les éleveurs doivent pouvoir obtenir auprès du vendeur des informations telles que :

- . La mobilité post-décongélation,
- . Le nombre réel de spermatozoïdes proposés (nombre de paillettes et nombre de spermatozoïdes par paillette) dont disposera la jument au cours de la saison et choisir leurs étalons aussi en fonction de ces éléments
- . Le taux de glycérol utilisé

Conclusion

VI. Conclusion :

Les techniques d'insémination artificielle permettent désormais d'obtenir une fertilité proche de celle obtenue en saillie naturelle (57 %, n=11260 cycles ; résultats Haras Nationaux, monte 98) à la condition de sélectionner la méthode la plus adaptée à la qualité de la semence de l'étalon concerné. Cependant un certain nombre d'étalons candidats, dont le potentiel génétique et/ou les performances sportives sont très intéressants pour les éleveurs, n'ont pas accès à ces méthodes de diffusion. Il est donc indispensable de poursuivre les efforts entrepris afin de mieux maîtriser les éléments indispensables à une survie optimale des spermatozoïdes *in vitro* et au maintien de leur fertilité *in vivo*.

**Références
Bibliographiques**

Références Bibliographies

- [1] BUDRAS et al, 2010 .
- [2] CHATELAIN, 1995 .
- [3] BARONE, 1978 .
- [4] ENGLAND, 2005.
- [5] TIBA- RY, BAKKOURY, 1994 .
- [6] TIBARY A, BAKKOWY M. *Reproduction equine. Tome II: l'étalon*. Actes 2005.
- [7] <http://www.haras-nationaux.fr/>.
- [8] BLANCHARD TL, et al. *Manual of equine reproduction. 2nd edition*. Mosby 2003.
- [9] *Livre : Insémination artificielle équine* écrit par Collectif, éditeur LES HARAS NATIONAUX 2014 .
- [10] KENNEY RM. *Manual for clinical fertility evaluation of the stallion*. Hastings, NE: Society of Theriogenology; 1983).
- [11] VARNER DD, VAUGHAN SD, JOHNSON L. *Use of a computerized system for evaluation of equine spermatozoa motility*. American Journal of Veterinary Research 1991;52:224-30.
- [12] Baronne R. *Chapitre II: Appareil génital mâle*. In: *Anatomie compare des mammifères domestiques. Tome 4. Splanchnographie II*. Vigot 2001, 83-250.
- [13] Thibault C. *La reproduction chez les mammifères et l'homme*. Ellipses 2001.