

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزاره التعليم العالي والبحث العلمي

MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

جامعة ابن خلدون تيارت

UNIVERSITE IBN KHALDOUN – TIARET

معهد علوم البيطرة

INSTITUT DES SCIENCES VETERINAIRES

قسم الصحة الحيوانية

DEPARTEMENT DE SANTE ANIMALE



Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme de docteur vétérinaire.

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Vétérinaires

Présenté par : Boudali Khaled

Benmerzoug Ghania

Thème

**Conservation de la semence et transfert embryonnaire dans l'espèce
équine**

Soutenu le 27 / 06 /2024

Jury:

Grade

Président : DERRAR Sofiane

Maitre de conférences A

Encadrant : AYAD Mohamed Amine

Maitre de conférences A

Co-encadrant : AYAD Issam

Doctorant

Examineur : SAIM Mohamed Said

Maitre de conférences A

Année universitaire 2023-2024

Remerciements

Nous remercions Dieu Le Tout Puissant, qui nous a donné la force, la volonté, et le courage pour la réalisation de ce travail.

Ce travail ne serait pas aussi riche et n'aurait pas pu avoir le jour sans l'aide et l'encadrement de **Mr AYAD MOHAMED AMINE**, je le remercie pour la qualité de son encadrement exceptionnel, pour sa patience, et sa disponibilité qui ont grandement contribué à la réalisation de ce travail.

Je souhaite remercier également mon Co-encadreur **Dr AYAD Issam**, qui a accepté de m'aider pour réaliser cette thèse et m'a offert des conseils précieux qui ont été une source d'inspiration tout au long de ce processus.

Je remercie également les membres de jury d'avoir accepté l'évaluation de ce modeste travail

Je souhaite remercier tout particulièrement monsieur **DERRAR Sofiane**, pour avoir accepté d'être président du jury et d'être disponible pour la soutenance. Soyez assuré monsieur de ma profonde gratitude.

Mes remerciements vont également à monsieur **SAIM Mohamed Said** pour avoir accepté de participer à ce jury et d'être examinateur de thèse, Soyez assuré monsieur de ma profonde gratitude.

Je remercie également du fond du cœur **Mr FEGHOULI Ahmed** propriétaire du HARAS ELMESK qui m'a accueillie chaleureusement au niveau de son haras et fait confiance pour la réalisation des différents prélèvements sur des étalons de valeurs.

Je remercie également **Mr FEGHOULI Karim, Mr FEGHOULI Adda**, dirigeants du HARAS ELMESK, **Dr BOUALI Khaled, Dr ANANE Ouadah** vétérinaires pratiquants au niveau du haras de m'avoir accueilli dans leur établissement, et mis à ma disposition tous les moyens nécessaires pour le bon déroulement du travail.

Mes remerciements à docteur **BELKHODJA Khadidja** directrice du centre national d'insémination artificielle et de l'amélioration génétique Tiaret, pour toutes les facilités qu'elle nous a faites.

Dédicace

Je remercie tout d'abord, Allah, le tout puissant Et clément de m'avoir
aidé à réaliser ce travail.

Je dédie ensuite ce fameux travail aux plus exceptionnels qui existent dans
le monde « mes parents »

A mon père : Mohamed et ma mère : Farida,
et qu'ils trouvent ici

Toute ma gratitude pour leur soutien tout au long de mes études

Qu'Allah me les garde

Mes adorables Frères, et bien sûr mon beau petit neveu « Ilyes»

Je dédie ce modeste travail à mes grands pères et grandes mères, mon
oncle «El Hadj Khaled», Rabbi Yerhamhom

A mon binôme «Ghania», Ce fut très agréable de travailler avec toi, Je
tiens à exprimer ma profonde gratitude pour votre soutien indéfectible,
votre collaboration précieuse et votre amitié inestimable tout au long de
cette aventure. Votre esprit d'équipe a rendu ce voyage non seulement
enrichissant, mais aussi mémorable. Merci pour tout.

Je tiens à remercier Lassouani Imene de m'avoir aidé dans tout ce qui
concerne L'outil informatique, pour sa disponibilité et son
encouragement.

Enfin, je dédie ce travail à toute personne qui m'a aidé de le réaliser
De près ou de loin sans exception.

Khaled

Avec mes sincères mots, je dédie le fruit de mes efforts à

Mon père, l'épaule solide qui ne s'incline jamais. Aucune dédicace ne peut exprimer l'amour et les sentiments que j'ai toujours pour toi je te dédie ce travail en témoignage de ma profonde appréciation la valeur de tes sacrifices.

Ma mère, à celle qui m'a fait une femme, mon exemple dans la vie, à ma merveilleuse maman. Je t'offre ma réussite qui j'espère va te rendre fière de moi face à tes sacrifices et ton encouragement dès mon premier jour dans la vie.

À mes grandes sœurs, mes deuxièmes maman, mon exemple dans la vie "Fatiha" et "Faiza" je vous dédie ce modeste travail comme récompense pour votre soutien constant, votre humour contagieux et votre présence réconfortante.

À mon frère "Ali", le soleil de mes jours et mon espoir dans la vie, Merci pour notre fraternité, notre enfance pleine des éclats de rire et notre jeunesse pleine de challenges.

À mon binôme "Khaled", merci d'être une partie de cette réussite qui était plus d'une collaboration entre deux collègues, tu as été une source de motivation pour moi tout au long ce parcours.

À moi même, avec une grande reconnaissance pour ma patience, mes efforts et mes sacrifices, je dis pour la courageuse "Ghania" : ce n'est que le premier pas de notre chemin, ne cesse jamais de suivre nos rêves, on y va un jour avec les larmes de la joie inchallah.

Ghania

Liste des figures

Figure 1 : Vagin artificiel Missouri	6
Figure 2 : Vagin artificiel (Hannover)	7
Figure 3 : Les paramètres cinétiques du spermatozoïde	18
Figure 4 : Les taux de survie cellulaire en fonction de la vitesse de refroidissement (COURBIERE & AL 2009).....	21
Figure 5 : Le processus de congélation de la semence équine (PONTHIER J., VAN DEN BERGHE F, 2014) ³¹	23
Figure 6 : mettre la semence dans un bain-marie a 22°C (PONTHIER J., VAN DEN BERGHE F, 2014) ³¹	24
Figure 7 : Phase d'équilibration de la semence a 4°C (PONTHIER J., VAN DEN BERGHE F, 2014) ³¹	26
Figure 8 : Vue dorsale de l'appareil reproducteur de la jument (Brinsko et al., 2011) ¹⁴	35
Figure 9 : Sinus urogénital de la jument (BARONE 1978) ⁶³	36
Figure 10 : Vue latérale de l'appareil reproducteur de la jument et des structures adjacentes (Brinsko et al., 2011) ¹⁴	38
Figure 11 : APPAREIL GÉNITAL ET ORGANES PELVIENS D'UNE JUMENT (BARONE 1978) ⁶³	41
Figure 12 : OVAIRE ET TROMPE UTÉRINE GAUCHES DE JUMENT (BARONE 1978) ⁵²	43
Figure 13 : Deux méthodes de synchronisation des chaleurs (BRUYAS et Al. 2013).	54
Figure 14 : Synchronisation de la donneuse et de la (des) receveuse(s) avant récolte et transfert d'embryon.	55
Figure 15 : schéma de la sonde de récolte d'embryons et du ballonnet de récolte (bo) au flacon muni de sa prise d'air (p). (c)dispositif pour clamper la sonde (b) ballonnet gonflé grâce a la seringue (s) d'après BRUYAS et LAGNEAUX.....	57
Figure 16 : Observation des embryons sous microscope.....	59
Figure 17 : structure histologique d'un embryon stade morula et blastocyste.	60
Figure 18 : Ovocyte non fécondée et dégénéré.....	60
Figure 19 : Embryon au 7ème jour, blastocyste.....	61

Liste des tableaux

Tableau 1 : Caractéristiques principales du sperme d'étalon.	12
Tableau 2 : Quelques caractéristiques du sperme de différentes races d'étalons de sport (DOWSETT, PATTIE 1987 CITE PAR NICHOLICH, 1989) ²¹	13
Tableau 3 : Quelques caractéristiques moyennes du sperme d'étalon en fonction de l'âge (DOWSETT, PATTIE 1987 CITE PAR NICHOLICH, 1989) ²¹	13
Tableau 4 : Classification de la qualité des doses de sperme congelé proposée par (Vidament, 2005) ³ (PONTHIER J., & AL 2014) ³¹	23
Tableau 5 : Composition du diluant de KENNEY [®] pour 1 L (Préparation simplifiée par l'utilisation de glucose isotonique) (BARRIER-BATTUT I. & AL 2014) ³³	28
Tableau 6 : Composition chimique du dilueur INRA 96 [®] (PILLET E, 2009).	29
Tableau 7 : distribution des embryons collectés en fonction de numéro de lavage-siphonage.	58
Tableau 8 : Échelle d'appréciation de la motilité massale du sperme. (D'après l'échelle de MILOVANOV, 1962).	72

Liste des abréviations

I/M : intra-musculaire

CASA : Computer Assisted Semen Analysis

Spz : spermatozoïdes

CSU : Colorado State University

IA : Insémination artificielle

FSH : Follicle-stimulating-hormone

LH : Luteinizing Hormone

PGF2alpha : Prostaglandines F2 alpha

INRA : Institut Nationale de Recherche Agronomique.

hCG : Human Chorionic Gonadotropin.

Table des matières :

Remerciements	I
Dédicace	II
Liste des figures	IV
Liste des tableaux.....	V
Liste des abréviations.....	VI
Résumé.....	XI
Abstract	XII
الملخص	XIII
Introduction.....	1
CHAPITRE 01 : LA COLLECTION ET LA CONSERVATION DE LA SEMENCE.....	2
1- Rappel Physiologique de la reproduction des étalons :	3
1-1 Puberté	3
1-2 Ejaculation.....	3
1-3 Sperme.....	3
1-4 Sex ratio	3
1-5 Collecte du sperme	3
2-La récolte	4
2-1 LE VAGIN ARTIFICIEL	6
3- Evaluation de la semence	7
3-1 Examens macroscopiques.....	7
a)Volume.....	7
b) Aspect et consistance.....	7
c) couleur.....	8
d) Viscosité, pH et poids spécifique.....	8
3-2 Examen microscopique.....	8
a) Détermination de la motilité massale	9
b) Détermination de la motilité individuelle.....	10
c) Détermination de la concentration	11
3-3 Examen morphologique	13
3-4 Examen microbiologique.....	15
3-5 Test de vitalité	16

3-6 L'analyse informatique de la semence (CASA : Computerized Assisted Sperm Analysis).....	16
4- Conservation de la semence	18
5- La cryoconservation de la semence équine.....	19
5-1 Définition	19
5-2 Objectifs	20
5-3 Le diluant de cryoconservation.....	20
5-4 Physique de la congélation et dommages subis par les cellules.....	20
a.....	20
5-5 La technique de congélation de la semence équine	22
5-5-1 Les règles à respecter lors de la fabrication des doses d'insémination artificielle Congelées :	22
5-5-2 Les étapes de la congélation de la semence équine	23
5-6 Rôle et caractéristique du dilueur	27
5-6-1 Les principaux diluants employés dans l'espèce équine	28
5-7 Les agents cryoprotecteurs	30
a) Les cryoprotecteurs non pénétrants.....	31
b) Les cryoprotecteurs pénétrants	31
5-8 Les agents antioxydants	32
CHAPITRE 02 : LE TRANSFERT EMBRYONNAIRE.....	34
1-Rappel Anatomique de l'appareil génital de la jument (BARONE, 1978) ⁶³ :.....	35
1-1 Le sinus uro-génital	36
1-2 Le vagin	37
1-3 Le cervix	38
1-4 L'utérus	39
1-5 Les trompes utérines.....	41
1-6 Les ovaires.....	42
2-Rappels de physiologie de la reproduction de la jument :	45
2-1 Saisonnalité	45
2-2 Evolution des évènements hormonaux du cycle ovarien	47
3- Le transfert embryonnaire	50
3-1 Définition :.....	50
3-2 Historique :.....	50
3-3 Avantages :.....	50
3-4 Inconvénients :	51

a) Technique :	51
b) Synchronisation donneuse-receveuse :	51
3-5 Technique de transfert embryonnaire	52
3-5-1 choix des juments.....	52
3-5-2 Les traitements de synchronisation des juments donneuses et receveuses :.....	53
Comme nous l'avons déjà mentionné, la synchronisation des ovulations de la donneuse et de la receveuse reste également un impératif à la réussite du transfert d'embryon.....	53
3-5-3 La récolte de l'éventuel embryon :	55
3-5-4 Le transfert de l'embryon à la receveuse :	61
3-6 conservations des embryons	63
a) La réfrigération :	63
b) La congélation.....	63
Taux d'embryon par récolte	64
Taux de gestation à J14 (diagnostic de gestation à 14 jours) par embryon transféré.....	64
Taux de gestation à J45 (diagnostic de gestation à 45 jours) par embryon transféré.....	64
Partie expérimentale.....	65
Objectifs	65
Matériel et méthodes.....	65
1- Lieux d'étude.....	65
2- Les animaux expérimentaux	66
Première partie : conservation de la semence équine.....	67
1- Déroulement de récolte.....	67
2-Filtration de l'éjaculat.....	70
3-Évaluation initiale de la semence	71
a) Volume.....	71
b) Couleur et aspect	71
a) Motilité massale	71
b) Motilité individuelle.....	72
4-Dilution de la semence	73
5- Décence de la température à 22°C.....	73
6- Centrifugation	74
7- Elimination du surnagent et rajout du 2eme diluant	74
8-Remplissage des paillettes.....	75
9- Décence de la température de 22°C à 4°C	76

10- Décente de la température de 4°C a -140°C	77
11- Evaluation des paillettes après décongélation	78
Deuxième partie : Transfert embryonnaire.....	79
1- Technique de transfert embryonnaire	79
Conclusion	87
Références bibliographique	88
Résultats et discussions	83

Résumé

Dans le but de connaître les effets de la congélation sur la qualité de la semence équine utilisée en insémination artificielle, nous avons collecté la semence d'un étalon de la race 'Pur- sang Arabe'. Après la récolte au vagin artificiel, la semence a été filtrée, puis analysée afin de déterminer leurs caractéristiques. La semence a d'abord été diluée avec deux milieux de dilution (Allemand et EquiPlus®). Cette semence fraîche peut être conservé **24h** à une température allant de **5 à 20C°**.

En vue d'une meilleure conservation et à long terme, la semence peut être congelée. Nous utilisons le milieu «EquiPlus®+ 2% de jaune d'œuf », et le milieu «Allemand + 20% de jaune d'œuf + 2.5% glycérol et 5 mg/ml de la vitamine C », afin d'améliorer la protection de la membrane plasmique des spermatozoïdes. Cette semence peut être entreposée après sa congélation dans de l'azote liquide **-196C°**. Au moment de son utilisation, cette semence est décongelée dans un bain marie à **37 °C** pendant **30** secondes. Après décongélation, nous devons procéder à son évaluation microscopique afin d'estimer le pourcentage des spermatozoïdes (la mobilité, la viabilité). Nous observons des résultats incohérents entre la mobilité des spermatozoïdes et la fertilité. L'usage de bons milieux de dilution, permet de garder la vitalité des spermatozoïdes, ce qui permet de garder leur pouvoir fécondant plus longtemps.

Le transfert embryonnaire est l'une des techniques nouvelles qui représente un grand Intérêt scientifique et économique, elle présente chez la jument différents avantages et champs d'application spécifiques. Dans la deuxième partie de notre étude un essai d'un transfert embryonnaire est réalisé chez une jument de la race arabe barbe, un suivi gynécologique et un traitement de synchronisation est fait pour la jument donneuse et receveuse. Lors de la récolte on assiste à l'absence de l'embryon.

Mots clés : Semence, congélation, décongélation, glycérol, transfert embryonnaire, embryon, fertilité, synchronisation.

Abstract

In order to know the effects of freezing on the quality of equine semen used in artificial insemination, we collected the semen of a stallion of the 'Pur- Sang Arabe' breed. After harvesting with the artificial vagina, the semen was filtered, then analyzed to determine their characteristics. The semen was first diluted with two dilution media (Allemand and EquiPlus®). This fresh seed can be stored for **24** hours at a temperature ranging from **5** to **20C°**.

For better and long-term conservation, the seed can be frozen. We use the "EquiPlus® + 2% egg yolk" medium, and the "Allemand + 20% egg yolk + 2.5% glycerol and 5 mg/ml vitamin C" medium, in order to improve the protection of the sperm plasma membrane. This seed can be stored after freezing in liquid nitrogen **-196C°**. When used, this seed is thawed in a water bath at **37°C** for **30** seconds. After thawing, we must carry out its microscopic evaluation in order to estimate the percentage of spermatozoa (mobility, viability). We observe inconsistent results between sperm motility and fertility. The use of good dilution media helps maintain the vitality of the spermatozoa, which allows them to maintain their fertilizing power for longer. Embryo transfer is one of the new techniques which represents a great scientific and economic interest, it presents different advantages and specific fields of application in the mare. In the second part of our study, an embryo transfer trial is carried out in a mare of the Arabian Barb breed, gynecological monitoring and synchronization treatment is carried out for the donor and recipient mare. During the harvest we see the absence of the embryo.

Key words: Semen, freezing, thawing, glycerol, embryo transfer, embryo fertility, synchronization

المخلص

من أجل معرفة آثار التجميد على نوعية السائل المنوي للخيل المستخدم في التلقيح الاصطناعي، قمنا بجمع السائل المنوي لفحل عربي اصيل. بعد استخلاص السائل المنوي من المهبل الاصطناعي، تتم تصفيته ومن ثم تحليله لتحديد خصائصه. تم (EquiPlus® و Allemand تخفيف البذور أولاً باستخدام وسيلتي تخفيف)

يمكن تخزين السائل المنوي لمدة 24 ساعة عند درجة حرارة تتراوح من 5 إلى 20 درجة مئوية.

ولحفظ أفضل وعلى المدى الطويل، يمكن تجميد السائل المنوي. نستخدم الوسط صفار البيض"، والوسط "الألماني + 20% صفار البيض + 2.5% + EquiPlus®" ، وذلك لتحسين حماية غشاء البلازما للحيوانات "C جليسيرول و 5 ملجم/مل فيتامين المنوية. يمكن تخزين هذه البذور بعد تجميدها في النيتروجين السائل -196 درجة مئوية. عند استخدامها، يتم إذابة هذه البذور في حمام مائي عند 37 درجة مئوية لمدة 30 ثانية. بعد الذوبان، يجب علينا إجراء تقييم مجهرى من أجل تقدير النسبة المئوية للحيوانات المنوية (الحركة، والقدرة على الحياة). نلاحظ نتائج غير متناسقة بين حركة الحيوانات المنوية والخصوبة. يساعد استخدام وسائل التخفيف الجيدة في الحفاظ على حيوية الحيوانات المنوية، مما يسمح لها بالحفاظ على قدرتها على التخصيب لفترة أطول

يعتبر نقل الأجنة إحدى التقنيات الجديدة التي تمثل أهمية علمية واقتصادية كبيرة، فهي تقدم مزايا مختلفة ومجالات محددة للتطبيق في الفرس. في الجزء الثاني من دراستنا، تم إجراء تجربة نقل الأجنة في فرس من سلالة أراب بارب، وتم تمت متابعة الفرس عن طريق جهاز الايكوغرافي وعلاج التزامن للفرس المانحة والمتلقية. أثناء عملية جمع الاجنة نرى غياب الجنين

الكلمات المفتاحية: السائل المنوي، التجميد، الذوبان، جليسيرول، نقل الأجنة، خصوبة الأجنة، التزامن.

Introduction

Depuis vingt ans, la congélation du sperme équin a permis de diffuser la génétique de nos meilleurs étalons et d'importer celle des champions. 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.

Malheureusement, des inconvénients subsistent. D'une part, après décongélation, la durée de vie des spermatozoïdes est courte, ce qui oblige à inséminer ou échographier plus souvent la jument (**Daels, 2003**)¹. 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**)² (**Vidament, 2005**)³.

Le transfert embryonnaire chez la jument est une pratique existant depuis les débuts des années **70** le 1er ayant été réalisé au Japon. S'étant développé plus tard que chez les animaux de production cette technique est toujours restée assez confidentielle dans le domaine équin et n'a pas connu le développement exponentiel qu'elle a connu chez les animaux de production en général et les bovins en particulier. Ce retard de développement a été imputable à plusieurs paramètres : intérêt économique limité, réticence des stud-books face à cette technique (**SAUVIER CHARLOTTE, 2016**)⁴.

Le transfert embryonnaire chez l'espèce équine a un rôle très important dans la conservation des races et l'amélioration génétique de ces dernières, de plus il joue un rôle économique et commercial très important.

L'objectif de notre étude est de faire une cryoconservation de la semence équine par l'utilisation de deux dilueurs différents (milieu Allemand et Equiplus). Le milieu allemand est supplémenté par un antioxydant (vit c) à raison de **5 mg/ml**.

Un essai de récolte et transfert d'embryon chez une jument.

CHAPITRE 01 : LA COLLECTION ET LA CONSERVATION DE LA SEMENCE

1- Rappel Physiologique de la reproduction des étalons :

1-1 Puberté : La puberté apparaît vers **2,5** ans. Les étalons effectuent la monte à partir de **3** (poneys et chevaux lourds) ou **4** ans. La production de spz par les testicules commence entre **13** et **20** mois (**NICOLICH, 1989**)⁵.

1-2 Ejaculation : L'étalon est sensible à des stimulations visuelles, olfactives (odeur de l'urine de jument en chaleur) et tactile entraînant le flehmen ou rictus sardonique : la lèvre supérieure est retroussée et la tête levée (**CHEVALIER, 1980**)⁶.

1-3 Sperme : La spermatogenèse dure **55** jours environ (**NICOLICH, 1989**)⁵ ou **35** à **42** jours (**CHEVALIER, 1980**)⁶. L'éjaculat est composé de **6** à **9** jets. L'éjaculation dure **6** à **7** secondes (**NICOLICH, 1989**)⁵.

Il est possible de distinguer :

- le pré-sperme, une sécrétion visqueuse qui coule pendant l'excitation sexuelle, avant le vrai sperme (rôle lubrifiant),
- la fraction riche des premiers jets, un mucus blanchâtre ou incolore, de **30** à **75** ml,
- le post-sperme, un gel trouble et visqueux, de **8** à **85** ml (rôle antimicrobien),
- la fraction post-coïtale, incolore, peu visqueuse et avec peu de gel (**NICOLICH, 1989**)⁵.

1-4 Sex ratio : Etant donné la longueur de l'œstrus et que l'étalon saillit chaque femelle en œstrus de nombreuses fois, il ne peut servir qu'un nombre limité de juments : de **15** à **30** juments.

1-5 Collecte du sperme : Certains étalons sont habitués à monter sur un mannequin. En général il faut recourir à une jument en œstrus. L'aire péri-génitale de celle-ci est nettoyée on lui met un tord-nez et on entrave ses membres postérieurs. Il vaut mieux que l'étalon soit manipulé par une personne qui le connaît, et dans un lieu qu'il connaît, sans stress. L'érection est plus ou moins rapide. L'éjaculation est relativement courte (**VALON ET CHAFFAUX, 1983**)⁸.

Le temps de réaction (entre le début des stimulations et la monte) est de **3,5 min (211 secondes)** pour le 1er éjaculat et de **3,85 min (231 secondes)** pour le 2eme, une heure plus tard en moyenne **(NICOLICH, 1989)⁵**.

2-La récolte :

La récolte du sperme constitue la première opération de l'insémination artificielle et/ou de son examen. Le vagin artificiel constitue le moyen classiquement utilisé quelque soit l'espèce animale. L'électro-éjaculation est également d'application dans les espèces bovine, ovine, canine et les volailles mais rarement utilisée chez l'espèce équine. Il est également possible chez la jument de recueillir le sperme directement dans le vagin.

a) Le premier temps du prélèvement consistera à monter le vagin artificiel. Le tube collecteur est dans l'espèce équine remplacé par un flacon dont la contenance est fonction du volume de l'éjaculat. Il sera gardé dans une étuve à **38°C**, et comportera pour le prélèvement un filtre de nylon. L'ensemble sera protégé par un sac iso-thermique. Il faut absolument éviter voire essuyer les projections d'eau qui se produiraient à l'intérieur du vagin. Elles sont en effet fatales aux spermatozoïdes **(CHEVALIER, 1980)⁶**.

La température de l'eau de remplissage du vagin artificiel sera comprise idéalement entre **40** et **45°C** et en aucun cas inférieure à **38°C**. Températures et pression seront aux besoins adaptés à chaque étalon. Il est indispensable d'attendre que la température mesurée au moyen d'un thermomètre se soit stabilisée entre **44** et **50°C** avant de procéder à la collecte proprement dite. Il est arrivé en effet que des étalons se soient brûlés. Juste avant le prélèvement proprement dit, on appliquera un gel non spermicide sur l'extrémité proximale du vagin artificiel **(VALON ET CHAFFAUX, 1983)⁷**.

b) Le second temps du prélèvement consistera à préparer la jument. Deux types de juments boute-en-train peuvent être utilisés. L'induction d'un comportement de chaleurs sur une jument castrée peut être obtenue par injection de benzoate d'oestradiol (**5 ml** en I/M deux fois par semaine à partir du 3ème jour précédant la période d'utilisation et jusque la fin de la période). Après une période d'adaptation, une seule injection hebdomadaire peut suffire. En cas d'utilisation d'une jument non castrée, on injectera après le 5ème jour suivant la fin des chaleurs naturelles une prostaglandine. La venue en chaleurs sera accélérée au besoin

par l'injection de 5 ml de benzoate d'oestradiol le jour de l'injection de la prostaglandine suivie d'une nouvelle injection 3 jours plus tard **(FAUQUENOT, 1987)⁸**.

La jument sera autant que faire se peut placer dans des conditions destinées à prévenir toute ruade et éviter ce faisant tout choc à l'étalon, conséquence qui peut avoir des répercussions psychologiques voire physiques et empêcher ou rendre plus difficiles des prélèvements de sperme ultérieurs. Le recours à des entravons est pour ce faire vivement recommandée. La queue de la jument sera enveloppée dans un ruban pour prévenir la contamination du pénis de l'étalon. De même, si plusieurs étalons sont prélevés avec la même jument, il est recommandé de laver la région périnéale de la jument entre chaque prélèvement, celle-ci pouvant être contaminée par le liquide clair souvent émis avant l'éjaculat proprement dit et plus riche en bactéries.

Il a été démontré que l'excitation optimale de l'étalon dépend davantage du cérémonial du prélèvement (personnel, vagin, local, signaux olfactifs...) que de la présence d'une jument **(VALON ET CHAFFAUX, 1983)⁷**.

c) Le troisième temps du prélèvement consistera à préparer l'étalon. La manipulation de l'étalon revêt une importance essentielle. Il est également important de disposer de structures permettant de tester la jument en chaleurs et ainsi de stimuler l'étalon. Une fois l'érection observée, le pénis sera lavé et massé au moyen de gants et d'eau chaude à **42°C**. Cette manipulation complète la stimulation sexuelle de l'étalon, enlève le smegma éventuellement présent à l'extrémité du gland et permet de détecter les lésions ou inflammations éventuelles du pénis et du gland. Ce rinçage à l'eau claire est particulièrement indiqué après une saillie naturelle ou si le pénis a été lavé au moyen de détergents **(NICOLICH, 1989)⁵**.

Une fois le vagin artificiel, la jument et l'étalon préparés, on réalise le prélèvement proprement dit. Il sera effectué sur un sol non glissant. Le plus souvent, l'étalon montera directement sur la jument. A ce moment, le pénis sera dirigé vers le vagin artificiel. Ce dernier sera maintenu de la main gauche et de la main droite appliquée à son extrémité proximale. L'éjaculation proprement dite se traduit par des pulsations du canal de l'urètre perceptibles manuellement.

Elle s'accompagne de mouvements de la queue ("flagging"). Au bout de deux à trois pulsations, l'extrémité antérieure du vagin est progressivement abaissée. Cette façon de faire permet de mieux séparer la première fraction riche en spermatozoïdes de la seconde représentée par le gel, émis en fin d'éjaculation (**CORDE, 1985**)⁹.

Le sperme récolté est débarrassé de sa portion gélatineuse et placé dès que possible dans un récipient gradué à **38°C** en vue de son examen et dilution ultérieure. Le filtre sera examiné pour identifier la présence éventuelle de débris cellulaires ou de cristaux.

2-1 LE VAGIN ARTIFICIEL :

L'étalon ne répondant que très difficilement à l'électro-éjaculation, le vagin artificiel constitue la méthode de choix pour prélever le sperme dans l'espèce équine. Le vagin artificiel pour l'étalon est semblable à celui utilisé pour le taureau mais son diamètre est plus grand. Il en existe divers modèles habituellement fermés de taille et de conformation différentes : **Missouri** (plus léger), **Hannover**, **Colorado** ou encore **CSU** pour citer les plus utilisés. Ils comportent le plus souvent deux manchons : les extrémités du premier seront repliées aux extrémités du vagin pour former une cavité qui sera remplie d'eau. L'extrémité proximale du second sera repliée de la même manière tandis que son extrémité distale laissée libre sera connectée au flacon collecteur. En pratique, il est idéal de posséder un vagin artificiel par étalon pour limiter le risque de transmission des germes et adapter la longueur du vagin à celle de la verge.



Figure 1 : Vagin artificiel Missouri



Figure 2 : Vagin artificiel (Hannover)

3- Evaluation de la semence :

L'évaluation de la qualité du sperme d'un animal vise en fait à rencontrer trois objectifs : le premier est d'identifier les animaux infertiles, le second est d'évaluer la fertilité d'un animal antérieurement infertile et le troisième à détecter les animaux dont la fertilité est supérieure.

La détermination de la qualité du sperme en suppose le prélèvement préalable et ensuite l'évaluation de divers paramètres d'examen macroscopique, microscopique ou biochimique de valeur inégale dont seule la concordance permet de tirer des conclusions valables.

3-1 Examens macroscopiques :

a) Volume : La quantité de sperme varie selon les espèces et pour une espèce donnée, selon l'état physiologique de l'individu, l'âge, la saison, les méthodes de récolte, la race ou encore les conditions sanitaires et alimentaires.

Chez le cheval le volume de l'éjaculat peut varier entre **40-320 ml** avec une moyenne de **100 ml** par éjaculat (**FAUQUENOT, 1987**)⁸.

b) Aspect et consistance : Le sperme normal est un liquide crémeux, épais, légèrement jaunâtre ou grisâtre, Il devient plus clair au fur et à mesure que sa concentration en spermatozoïdes diminue.

Celui de l'étalon est opaque blanc grisâtre. Il comporte trois fractions : la première d'aspect aqueux ne renferme que peu de spermatozoïdes. La deuxième claire renferme la masse des spermatozoïdes. La troisième enfin est visqueuse et contient le produit des sécrétions séminales et des glandes de Cowper.

c) couleur : Le plus souvent blanchâtre, la couleur des spermes peuvent être modifiées pour des raisons physiologiques (concentration) mais le plus souvent pathologiques. Certains étalons ont un sperme de couleur jaunâtre imputable à la présence d'un colorant lipochrome, provenant des vésicules séminales et dont la présence est sans rapport avec l'alimentation. Cette couleur jaune peut également résulter de la présence de pus ou d'urine, ce qui compromet le pouvoir fécondant du sperme. La coloration rosée ou rougeâtre résulterait de la présence de sang.

d) Viscosité, pH et poids spécifique : La viscosité dépend de la concentration en spermatozoïdes. Comparée à l'eau distillée (**1**), la viscosité du sperme de l'étalon est variable. Elle dépend également de sa conductibilité électrique c'est-à-dire de sa concentration en ions.

La mesure du pH (pH mètre, papier indicateur) doit être immédiate, le sperme s'acidifiant rapidement étant donné la formation d'acide lactique. Sa valeur normale doit être comprise entre **6.5** et **6.8**. Chez l'étalon, le pH du sperme est compris entre **6.2** et **7.8**. D'une manière générale, les spermes forts concentrés et riches en fructose accusent une diminution plus rapide du pH que les autres du fait de l'accumulation plus rapide d'acide lactique due à une glycolyse plus intense, ce qui indirectement témoigne leur meilleure qualité.

3-2 Examen microscopique:

Comme son nom l'indique, cet examen fait principalement appel au microscope. Il existe néanmoins d'autres méthodes moins classiques pour compléter la collecte d'informations permettant de procéder à une évaluation aussi précise que possible de la qualité d'un éjaculat.

L'examen microscopique sera réalisé autant que possible, dans les minutes qui suivent le prélèvement et selon la nature des examens microscopiques en respectant les conditions thermiques optimales.

L'examen microscopique permettra notamment de poser le diagnostic de l'une ou l'autre anomalie dont il est important de rapporter les définitions. On parlera d'asthénospermie ou d'asthénozoospermie si la motilité individuelle est inférieure à **30 %** ou si la note de motilité massale est inférieure à **2**. On parlera d'azoospermie en cas d'absence de spermatozoïdes dans l'éjaculat. On parlera de nécrospermie si l'on observe une proportion élevée de spermatozoïdes morts. L'oligospermie traduit une concentration faible en spermatozoïdes (**< 300.000 / mm³**). La tératospermie ou tératozoospermie traduit la présence d'une proportion élevée en spermatozoïdes anormaux (**> 30 %**).

a) Détermination de la motilité massale :

L'emploi du terme motilité et non mobilité signifie que les spermatozoïdes se meuvent par eux-mêmes et ne se déplacent pas passivement. La motilité du spermatozoïde est due à la contraction du filament axial. L'examen de la motilité doit se faire le plus rapidement possible après le prélèvement en le maintenant rigoureusement à une température voisine de **38°C**. La progression des spermatozoïdes est habituellement rectiligne. Au cours de leur déplacement, ils subissent une rotation autour de leur grand axe. Dans la queue de l'épididyme, les spermatozoïdes sont immobiles. Leur motilité dépend de leur présence dans un milieu de pH et de température normale, renfermant en quantités adéquates nutriments et ions, conditions offertes une fois qu'ils sont présents dans les sécrétions séminales. On comprend ainsi aussi pourquoi leur motilité peut facilement être inhibée en cours de prélèvement par la présence de contaminants chimiques sur les lames, ou d'urine. La motilité massale dépend essentiellement de trois facteurs : la concentration, le pourcentage de spermatozoïdes mobiles et de la vitesse de déplacement des spermatozoïdes. Ils doivent être pris en considération dans l'interprétation du score de la motilité massale.

Sur une échelle d'évaluation de **1** à **4**, un sperme de très bonne qualité (**4**) montre des tourbillons noirs et rapides. S'il est de bonne qualité (**3**), ces tourbillons seront moindres et plus clairs. S'il est de qualité correcte, les tourbillons ne sont plus visibles et on devine la présence d'une mobilité individuelle (**2**). S'il est enfin de mauvaise qualité, il n'y a plus voire presque plus de mobilité individuelle (**1**). Il n'est habituellement pas nécessaire de poursuivre les examens si le sperme a une mobilité massale de **1**. A l'inverse, en cas

d'absence de mobilité massale, l'examen doit être complété par l'examen de la mobilité individuelle. En général, on a tendance à sous-estimer une bonne mobilité massale et à la surestimer quand elle est mauvaise. L'examen de la motilité massale ne donne qu'une idée forte approximative du pourcentage de spermatozoïdes mobiles. Mieux vaut donc recourir à l'examen de la motilité individuelle.

b) Détermination de la motilité individuelle :

L'analyse du sperme sur le terrain nécessite un microscope à plaque chauffée à **37 °C**, des lames et des lames de recouvrement. L'examen visuel du sperme conduit à une subjectivité individuelle, mais il existe des moyens de la limiter. La motilité peut être évaluée dans le sperme natif brut, mais les échantillons doivent également être dilués avec un agent d'extension de sperme frais équin commercial à la même faible concentration (**20 à 30 × 10⁶ spz/mL**) (**Varner D.D., 2008**)¹⁰. Pour limiter l'influence naturelle de la concentration sur l'évaluation de la motilité, car les yeux et le cerveau humains surestimeront les échantillons avec une concentration plus élevée mais la même motilité. Une autre astuce serait d'évaluer la motilité du sperme pendant seulement **30** secondes, car les yeux humains se concentrent rapidement sur les spermatozoïdes en mouvement, ce qui conduit à une surestimation (**Vidament M., 2005**)³.

Le dernier conseil serait de se former régulièrement et d'accepter que la répétabilité des évaluations visuelles au microscope entraîne généralement des variations de **10%** et **5%** pour les opérateurs les plus formés.

Pour remédier à ces limitations, des analyseurs de sperme assistés par ordinateur (CASA) ont été développés. Certaines caméras dédiées peuvent être branchées sur le microscope à plaque chauffante, tandis que d'autres appareils sont conçus avec une chambre intérieure pour l'analyse : celles-ci sont plus coûteuses mais protégeront les spermatozoïdes des fluctuations extérieures de température et de lumière. Deux types différents de lames pour analyse sont également disponibles : celles où la goutte de sperme est placée entre la lame et un couvercle (sous une lamelle lors de l'examen microscopique de lames, Makler TM et appareils associés) et celles par lesquelles le sperme entrera dans la lame par la capillarité (Leja TM, Isos TM) (**Hoogewijs M., et al, 2010**)¹¹. Ce choix aura un impact sur les résultats et donc sur le paramètre à utiliser. Pour obtenir des résultats significatifs, CASA nécessite une

concentration adéquate, généralement comprise entre **20** et **30 × 10⁶** spz/mL, mais en fonction de l'appareil (**Parilla S., et al, 2012**)¹². En diluant le sperme avec un diluant commercial, comme mentionné précédemment, pour analyser de **700** à **900** spermatozoïdes.

c) Détermination de la concentration :

La concentration exprime le nombre de spermatozoïdes par mm³ (ou par ml), La concentration du sperme est corrélée à la couleur du sperme, qui va de l'aspect translucide à l'aspect laiteux. Cependant, des conditions pathologiques peuvent modifier cette couleur et rendre cette appréciation imprécise. Historiquement, la concentration en spermatozoïdes était déterminée manuellement avec un microscope optique à l'aide de chambres de comptage telles que Thoma ou Makler (**Hoogewijs et al, 2011**)¹³. Par la suite, les méthodes de photométrie ont diminué la durée de la procédure, mais avaient parfois une faible précision (**Brinsko S.P. et al, 2011**)¹⁴. À l'heure actuelle, les méthodes de perméabilisation de la membrane et de coloration du noyau avec un iodure de propidium (PI) (NucleoCounterTM, Chemometec, Allrod, Danemark) sont des méthodes fiables et utiles pour les laboratoires de production (**Johansson C.S., et al, 2008**)¹⁵. Malgré l'investissement nécessaire. La concentration normale de spermatozoïdes chez les étalons varie entre **100 × 10⁶** et **600 × 10⁶** spz/mL (**Janett F., et al, 2003**)¹⁶.

Comme indiqué ci-dessus, lorsqu'elles sont interprétées séparément, les valeurs de volume et de concentration ne donnent qu'un aperçu des conditions de formation et de collecte des étalons. Cependant, lorsque ces données sont utilisées ensemble, elles peuvent aider à comprendre la capacité de production réelle et observée des spermatozoïdes, en utilisant le nombre total de spermatozoïdes (TSN), qui est calculé comme suit :

$$\text{TSN} (\times 10^6 \text{ spz}) = \text{Volume (mL)} \times \text{Concentration} (\times 10^6 \text{ spz/mL}).$$

Chez les étalons, le TSN attendu est compris entre **4** et **12 × 10⁹** spz, selon la saison, l'étalon et la taille des testicules (**Janett F., et al, 2003**)¹⁶. Après un long repos sexuel, l'accumulation de spermatozoïdes vieillissants entraînera une augmentation du TSN, associée à une faible viabilité et motilité, depuis le premier prélèvement jusqu'à la stabilisation.

Cependant, la stabilisation du TSN par éjaculat peut conduire au recrutement de spermatozoïdes immatures dans l'épididyme (**Pickett B.W., 1993**)¹⁷. Ceci peut être évalué en comparant le DSO et la production quotidienne de spermatozoïdes (DSP), calculés comme suit, lorsque le TSN est stabilisé :

DSP (sur 10 jours) = (TSN J1 + TSN J3 + TSN J5 + TSN J8 + TSN J10)/10 (= nb. de jours).

Si le DSP est supérieur au DSO, cela pourrait potentiellement signifier que le rinçage des spermatozoïdes vieillissants stockés dans la queue de l'épididyme n'est pas encore terminé, ou que le programme de collecte est trop pénible pour l'étalon, ce qui pourrait être confirmé par une augmentation dans les gouttelettes distales lors de l'analyse morphologique des spermatozoïdes (**Rao D.N., et al, 2011**)¹⁸. Si le DSP est inférieur au DSO, une pathologie précoce du testicule ou une obstruction des canaux excréteurs peuvent être suspectées, comme dans les bouchons des ampoules, ce qui peut être confirmé par la diminution de la phosphatase alcaline dans le sperme (**Amann R.P., et al, 2011**)¹⁹. Et par échographie (**Weber J.A., Woods G.L., 1992**)²⁰.

Tableau 1 : Caractéristiques principales du sperme d'étalon.

Volume total (ml)	Concentration (10 ⁶ /ml)	Nombre total (10 ⁹)	Motilité (%)	Référence
70 (30-300)	120 (30-8000)			Kolb, 1975
60-120	50-350		60	Corde, 1985
60-100	150-300	5-15	40-75	Hafez, 1987
30-50 ou 120-150	100-200		60-80	Fauquenot, 1987
52,5 ± 34,1	200 (50-400)	10 (3-20)	75	Besse, 1993
	176 ± 125	7,8 ± 5,7	59±14	Langlois 1977.

Ces caractéristiques varient avec la race (Tableau 2), l'âge de l'étalon (Tableau 3), la saison de la fréquence d'éjaculation, etc.

Tableau 2 : Quelques caractéristiques du sperme de différentes races d'étalons de sport (DOWSETT, PATTIE 1987 CITE PAR NICHOLICH, 1989)²¹.

Races	Nombre	Vol. sans gel (ml)	Vol. de gel (ml)	Vol. total (ml)	Concentr. (10 ⁶ /ml)	Nbre de spz (10 ⁶)	Spz morts (%)
P.S.A.	73	36,2	1,0	37,2	286,8	12 661	10,1
Quarterhorse	30	23,8	4,0	27,8	171,7	5 372	23,8
Pur Sang	141	28,3	2,7	31,0	114,3	5 027	21,6
Arabe 1/2 sang	73	33,2	5,5	38,7	116,1	4 854	17,1
A.Q.P.S.	111	30,2	3,1	33,3	97,2	4 738	15,4
Palomino	44	23,8	1,1	24,9	138,5	4 016	21,3
Appaloosa	18	23,3	2,0	25,3	90,4	3 331	15,8
Shetland	8	44,4	13,1	57,5	101,3	1 720	38,5
Poney	38	20,8	2,5	23,3	114,0	1 122	24,7
Moyenne		29,3	3,9	33,2	136,7	4 760	20,9

Tableau 3 : Quelques caractéristiques moyennes du sperme d'étalon en fonction de l'âge (DOWSETT, PATTIE 1987 CITE PAR NICHOLICH, 1989)²¹.

Tableau 3 : Quelques caractéristiques moyennes du sperme d'étalon en fonction de l'âge (DOWSETT, PATTIE 1987 CITE PAR NICHOLICH, 1989)²¹.

Age	Nombre	Vol. sans gel (ml)	Vol. de gel (ml)	Vol. total (ml)	Concentr. (10 ⁶ /ml)	Nbre de spz (10 ⁶)	Spz morts (%)
1-2 ans	28	15,6	0,4	16	43,4	481	30,8
3-13 ans	427	30,2	4	34,2	147,8	5 053	18,8
>13 ans	81	33,7	1,4	35,1	83,2	3 252	22,8

3-3 Examen morphologique :

La technique la plus fréquemment utilisée pour évaluer la morphologie des spermatozoïdes consiste à étaler du sperme sur une lame, à le sécher à l'air, à le colorer à l'aide de différents moyens de coloration disponibles (Wright, Giemsa, hématoxyline-éosine) et à observer au moins **100** spermatozoïdes ayant un profil commun. Microscope à grossissement **×1000**. Les kits commerciaux Diff-Quick sont conçus pour fournir un moyen de coloration rapide, facile et sur le terrain du sperme (**Varner D.D., 2008**)¹⁰. Ce qui donnera aux praticiens l'accès à des évaluations morphologiques de base qui pourraient être cliniquement pertinentes.

Cependant, cette technique peut entraîner certains dommages aux spermatozoïdes, tels que des têtes séparées, ce qui entraînera une mauvaise interprétation **(Rao D.N., et al, 2011)¹⁸**.

Et la coloration peut nuire à la visualisation de petits détails structurels **(Varner D.D., 2008)¹⁰**. L'allongement des temps de coloration Diff-Quick à **5** ou **30** min **(Pozor M.A., et al, 2012)²²**. Peut conduire à une qualité de lame observée similaire à la méthode de référence, mais nuit à ses principaux intérêts : la rapidité et la facilité de réalisation. Actuellement, la technique de référence pour l'analyse de morphologie fine consiste à diluer le sperme **(1v/40v)** dans du formaldéhyde **4%** à **37 °C**, à déposer une goutte de **5 µL** sur une lame à **37 °C** sous une lame de recouvrement, puis à analyser **200** spermatozoïdes. Avec microscopie de contraste à **×1000** **(Rao D.N., et al, 2011)¹⁸**. Des applications morphologiques dédiées sont incluses dans certains appareils CASA. D'après l'expérience de l'auteur, cette caractéristique peut être utile dans la production quotidienne **(Gravance C.G., et al, 1997)²³**. Mais devrait être régulièrement contrôlée par une évaluation morphologique manuelle, car certaines anomalies ne sont pas correctement évaluées par le CASA.

Les anomalies morphologiques des spermatozoïdes sont divisées en anomalies primaires, liées à des défauts de production testiculaire, anomalies secondaires, liées à une maturation altérée des spermatozoïdes dans le système de canaux excréteurs, et anomalies tertiaires résultant de procédures de collecte ou de manipulation inappropriées du sperme. A titre d'exemple, l'augmentation des gouttelettes distales dans le sperme est liée à une surexploitation de l'étalon, conduisant à l'excrétion de spermatozoïdes non totalement mûris dans l'épididyme, avec un DSP supérieur au DSO **(Aziz N., et al, 2004)²⁴**. Un choc froid sur la glissière entraînera également des anomalies de l'extrémité de la pièce finale, comme une queue roulée. Des têtes multiples ou hypertrophiées ou des pièces intermédiaires gonflées sont généralement liées à des anomalies de production dans le testicule **(Rao D.N., et al, 2011)¹⁸**. De plus, les têtes amorphes ou les noyaux hétérogènes ont été associés respectivement à des réactions de capacitation ou acrosomes et à une fragmentation de l'ADN **(Berkovitz A., et al, 2006)²⁵**. Qui sont davantage liées à des anomalies secondaires causées par la composition du plasma séminal ou par les procédures de conservation du sperme. L'indice de déformation des spermatozoïdes (SDI) est une analyse microscopique assistée par ordinateur de la morphologie du noyau des spermatozoïdes qui a été associée à

des dommages à l'ADN induits par le stress, mais nécessite un équipement microscopique spécifique (Said T.M., et al, 2005)²⁶.

La proportion globale d'anomalies ne doit pas dépasser **35 %** chez les étalons, avec un maximum de **5 %** et **10 %** pour chaque anomalie primaire et secondaire, respectivement (Brinsko S.P. et al ,2011)¹⁴. Cependant, une valeur ponctuelle ne fournira pas d'informations utiles pour aider à comprendre l'évolution du processus. À titre de premier exemple, la proportion élevée de gouttelettes distales montre que la production est entravée, mais une diminution de cette anomalie lors des collectes ultérieures de sperme signifie que la gestion a été améliorée. Un autre exemple est l'augmentation d'une anomalie primaire, comme le gonflement des pièces intermédiaires, de **3** à **6 %** : c'est un véritable signal de dégénérescence testiculaire en cours.

Ces considérations mettent en évidence l'importance de l'évaluation du sperme sur plusieurs spermogrammes différents pour évaluer l'évolution des processus.

3-4 Examen microbiologique :

Le prélèvement de sperme est une procédure non stérile, sauf lorsqu'il est réalisé par aspiration de l'épididyme. Le plasma séminal est un milieu de culture parfait pour les bactéries, et le sperme équin est connu pour contenir diverses espèces bactériennes. Parmi ceux-ci, certains présentent un potentiel de transmission vénérienne chez l'équidé, notamment *Taylorella equigenitalis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, et éventuellement des streptocoques bêta-hémolytiques tels que *Streptococcus equi*. Conduisant ainsi à l'utilisation d'une gestion spécifique des étalons et de la semence. les pratiques. Cependant, de nombreuses autres bactéries ne sont pas pathogènes, comme diverses espèces de *Streptococcus*, *Acinobacter*, *Aerobacter*, *Proteus*, *Staphylococcus* et *E. coli* (Baumber-Skaife J., 2011)²⁷. Des recherches récentes suggèrent que ces bactéries pourraient avoir un impact sur la conservation du sperme frais et froid (Varela E., et al, 2018)²⁸. Par conséquent, des méthodes permettant de contrôler leur croissance dans le sperme, sans ajouter empiriquement d'antibiotiques à large spectre à l'extenseur, sont actuellement étudiées (Al-kass Z., et al, 2019)²⁹.

3-5 Test de vitalité :

Dans le vocabulaire andrologique actuel, la viabilité est définie par l'Organisation mondiale de la santé comme l'intégrité de la membrane, bien que l'activité mitochondriale ou l'intégrité de l'ADN puissent également être considérées comme des facteurs de viabilité. La coloration à l'éosine-nigrosine est une évaluation facile sur le terrain de la membrane, car l'éosine ne traverse que les membranes des spermatozoïdes morts (**Brinsko S.P. et al, 2011**)¹⁴. alors que les spermatozoïdes vivants ne sont pas colorés. En utilisant la même logique, les appareils utilisés pour évaluer la concentration avec la coloration à l'iodure de propidium des spermatozoïdes (NucleoCounterTM, Chemometc, Allrod, Danemark) peuvent être utilisés pour doser la proportion de spermatozoïdes membranaires intacts lorsque la membrane n'est pas perméabilisée avant le test (**Johansson C.S., et al, 2008**)¹⁵. Ces méthodes sont faciles à réaliser en laboratoire et peuvent éviter l'utilisation de la cytométrie en flux. La viabilité obtenue avec cette définition est normalement supérieure à **70%** et est normalement assez bien associée à la TM.

3-6 L'analyse informatique de la semence (CASA : Computerized Assisted Sperm Analysis) :

L'analyseur informatique de la semence ou communément appelé le système **CASA** est une méthode microphotographique. Il consiste en un dispositif incluant un matériel d'enregistrement microphotographique et en un support informatique pour la reconstruction et l'analyse des trajets. Cette technique permet de générer un nombre considérable de paramètres, obtenu grâce à l'analyse individuelle de chaque spermatozoïde. Cette technique permet donc de réaliser des analyses objectives et précises sur la proportion de spermatozoïdes mobiles et leur mouvement.

Il calcule plusieurs paramètres de mobilité à savoir :

a) La motilité totale (TMOT) : Ce paramètre représente le pourcentage des gamètes qui bougent indépendamment de leur qualité de mouvement par rapport à la population totale.

b) Le pourcentage des spermatozoïdes progressifs (PMOT) : Ce paramètre inclut tous les spermatozoïdes ayant une VAP > **50** µm/seconde et une linéarité (VSL/VAP) supérieure à **75%**.

c) Le pourcentage des spermatozoïdes statiques : Il représente tous les spermatozoïdes qui ne bougent pas pendant l'analyse.

d) les mouvements rapides : moyens et lents des spermatozoïdes (Speed, Medium et Slow).

e) les différentes vitesses de progression :

La **"VCL"** (Velocity Curvilinear): Cette vitesse prend en considération la totalité de la distance (point par point) parcourue par le spermatozoïde pour un temps donné.

La **"VSL"** (Velocity Straight line) : Cette vitesse prend en considération, pour un temps donné, les points de départ et d'arrivée du spermatozoïde, indépendamment de son trajet.

La **"VAP"** (Velocity Average Pathway) : Cette vitesse correspond à la VCL, mais après lissage de son trajet.

L'ALH (Amplitude of Lateral Head Displacement) : Ce paramètre correspond à la distance, en μm , balayée par la tête des spermatozoïdes durant le mouvement de battement.

Le **BCF** (Beat Cross Frequency) : Il mesure en Hertz la fréquence de battement de la tête des spermatozoïdes en mouvement (nombre de battement par unité de temps).

Il s'agit d'une méthode d'analyse rapide qui permet d'analyser un grand nombre de spermatozoïdes en un bref temps. Cependant, ce test nécessite un appareillage coûteux réservé pour les centres spécialisés.

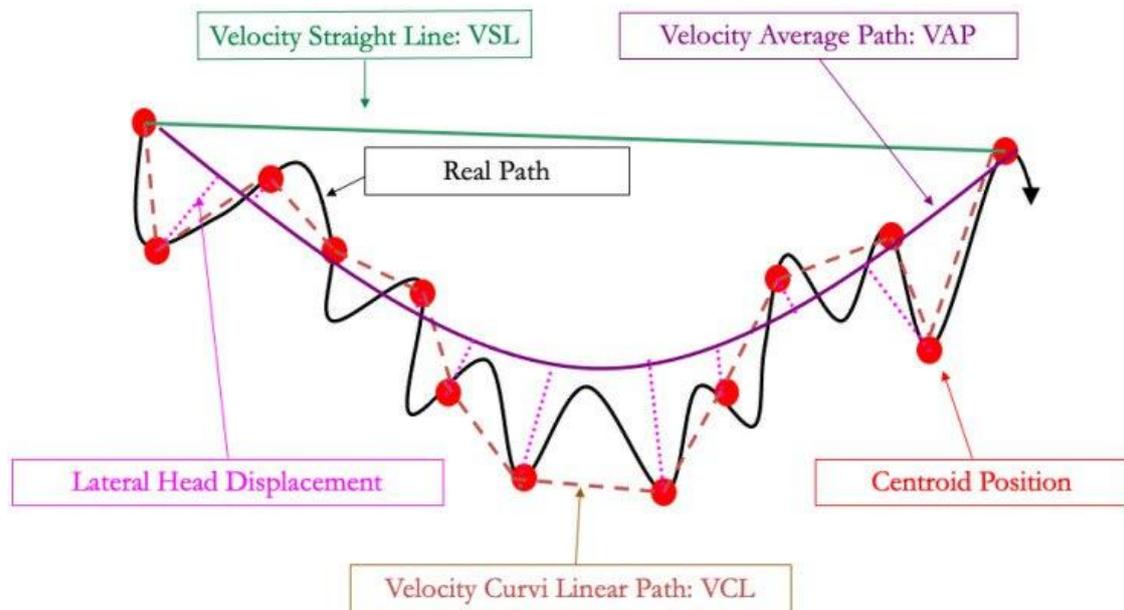


Figure 3 : Les paramètres cinétiques du spermatozoïde

Le CASA prend des photos pendant **0,5 s** à **60 Hz** et suit le centroïde de chaque spermatozoïde pour calculer les différentes vitesses décrites dans la (figure 3). La vitesse du chemin curviligne (VCL) est la vitesse du chemin suivant les **30** positions du centre de gravité acquises pendant les **0,5 s**. La vitesse du trajet en ligne droite (VSL) est la vitesse du trajet entre la position du centroïde au début de l'analyse et à la fin de l'analyse, **0,5 s** plus tard. La trajectoire moyenne de vitesse (VAP) utilise un lissage géométrique de la VCL sur la VSL et détermine la vitesse de cette trajectoire sur la période de **0,5 s**. L'ordinateur déterminera également la linéarité (LIN), la rectitude (STR) et l'oscillation (WOB) à l'aide de ces rapports de paramètres.

4- Conservation de la semence :

Le sperme peut être utilisé frais, réfrigéré progressivement à **12-14°C** (dans les **24 à 96** heures) ou plus souvent **4°C** (**0-5°C**, jusqu'à **8** jours) ou congelé dans l'azote liquide. Le sperme dilué peut être conservé au réfrigérateur réglé à **7°C**.

Pour le sperme frais : les doses de **20 ml** comprennent **400** millions de spz. Avec des doses de **400** millions de spz, et un rythme de **3** récoltes par semaine, au moins **20** doses de semence peuvent être produites par éjaculat (FAUQUENOT, 1987)⁸.

Pour le sperme réfrigéré : immédiatement après la récolte, le sperme est dilué dans un bainmarie maintenu à **35-37°C**. La reproduction du cheval a été étudiée dans les années **1950** par Nishikawa au Japon qui a mis au point les premier dilueurs pour la semence d'étalon.

Les dilueurs ont un pH proche de celui du plasma séminal, apportent des éléments nutritifs et contiennent des substances tampon, des antibiotiques et des cryoprotecteurs, ces derniers protégeant les spz des effets de la congélation et de la décongélation

La vitesse du refroidissement doit être contrôlée et adaptée à la température de conservation.

Pour la conservation à **+4°C**, une descente initiale de **- 0,3°C** par min est idéale soit **10** heures pour passer de **+37°C** à **+4°C**. (**Palmer, et al, 1984**)³⁰ utilise du lait écrémé ajouté d'antibiotiques comme dilueur. L'insémination doit être faite dès les **10** heures qui suivent la collecte.

5- La cryoconservation de la semence équine :

Le succès de la congélation de la semence bovine a impulsé de nombreuses recherches pour développer ces techniques dans les autres espèces de mammifères domestiques, en particulier dans l'espèce équine.

Initialement, les techniques mises au point dans l'espèce bovine ont été extrapolées à l'espèce équine, et ont montré des résultats décevants. La persévérance des chercheurs a permis d'adapter ces techniques aux particularités de la semence équine, améliorant ainsi les résultats de fertilité par cycle.

5-1 Définition :

La cryoconservation est la conservation à une température inférieure à **-80°C** d'une suspension de cellules après leurs préparations. Cette conservation peut-être dure plusieurs années et son utilisation après réchauffement à une température de **37°C**.

5-2 Objectifs :

La cryoconservation permet de conserver le génome de spermatozoïdes pendant des dizaines d'année sans l'altérer. Elle permet donc de conserver le matériel génétique d'espèces de bonne qualité ou en danger.

5-3 Le diluant de cryoconservation :

Le diluant est un milieu spécifique est employé pour diluer la semence et qui protège les spermatozoïdes contre les effets délétères de la congélation.

5-4 Physique de la congélation et dommages subis par les cellules : La cryoconservation des cellules consiste à utiliser des températures extrêmement basses pour préserver leur structure intacte et viable (PONTHIER J., VAN DEN BERGHE F, 2014)³¹. Lors de la réfrigération le métabolisme cellulaire est réduit, ce qui augmente la durée de conservation des spermatozoïdes (BARBAS J.P., MASCARENHAS R.D., 2008)³². Lors de la cryoconservation l'activité cellulaire est interrompue et rétablie après remise à température corporelle de la semence, ce qui équivaut presque à interrompre le « cours du temps biologique » pour la cellule.

Il existe actuellement deux méthodes pour la cryoconservation des spermatozoïdes : la congélation et la vitrification. La première technique consiste à congeler de façon lente tandis que dans la seconde, les taux de refroidissement sont très élevés.

Chacune de ces techniques nécessite l'emploi d'agents cryoprotecteurs, à des concentrations particulièrement élevées lors de la vitrification ce qui pose des problèmes de toxicité aux spermatozoïdes.

Enfin, lors du processus de cryoconservation des gamètes mâles, ces derniers sont exposés à plusieurs mécanismes aux effets délétères considérables s'ils ne sont pas maîtrisés :

a) **Le cold-shock** : phénomène commun à la réfrigération et à la congélation de la semence qui est détaillé plus haut.

b) **La cristallisation intracellulaire** : qui engendre des lésions mécaniques des structures intracellulaires telles que les organelles.

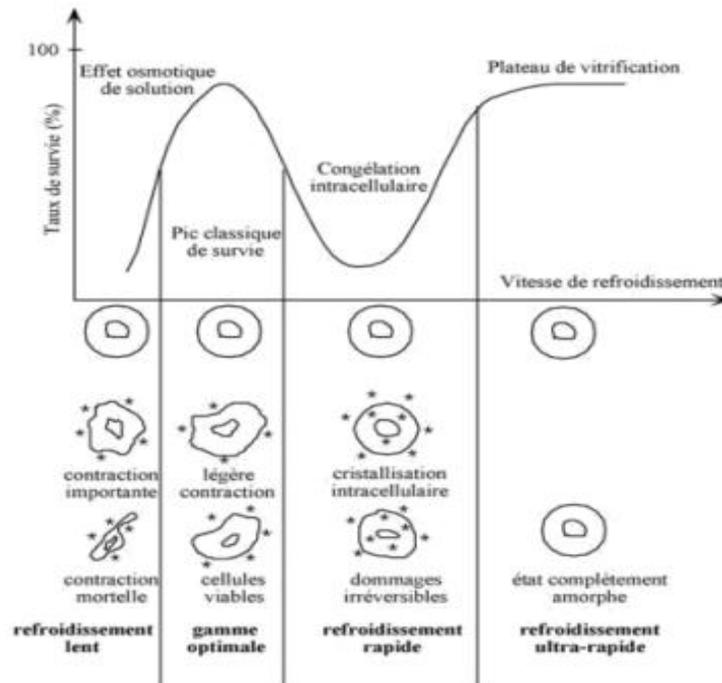


Figure 4 : Les taux de survie cellulaire en fonction de la vitesse de refroidissement (COURBIERE & AL 2009).

Un refroidissement lent entraîne la formation de cristaux de glace dans le milieu extracellulaire. Les cristaux de glace étant exclusivement composés d'eau pure, la concentration du milieu extracellulaire augmente ce qui entraîne une sortie de l'eau intracellulaire et donc une déshydratation cellulaire par effet d'osmose. Cette déshydratation s'accompagne d'une déformation cellulaire, à l'origine de contraintes mécaniques substantielles sur la membrane plasmique. Lorsque ce phénomène est trop marqué, ces contraintes mécaniques peuvent causer la mort des cellules.

Un refroidissement rapide empêche la déshydratation cellulaire par effet osmotique, car l'eau n'a pas le temps de quitter les cellules pour rétablir l'équilibre de part et d'autre de la membrane plasmique. Cela conduirait à la cristallisation intracellulaire. Il semble cependant qu'il n'y ait pas de preuve de formation de glace intracellulaire, et que les effets délétères du refroidissement rapide soient plutôt le fait d'un déséquilibre osmotique au moment de la congélation.

Il existe une vitesse de congélation optimale (ou plutôt la moins néfaste possible) pour chaque type cellulaire, associée à un taux de survie cellulaire maximum, qui est un compromis entre une vitesse suffisamment lente pour permettre à l'eau de sortir de la

cellule et ainsi prévenir la formation de cristaux de glace intracellulaire et une vitesse trop lente responsable de déshydratation cellulaire, qui engendre une compaction et une déformation du spermatozoïde.

La vitesse de congélation optimale de la semence équine, en présence d'agent cryoprotecteur, est de **-60°C** par minute.

Enfin l'intervalle de températures comprises, selon les sources, entre **0** et **-80°C** ou entre **-55** et **-70°C** est très délicat à traverser, tant au moment de la congélation que de la décongélation des spermatozoïdes. Le traverser rapidement permet de limiter les dommages cellulaires.

5-5 La technique de congélation de la semence équine :

5-5-1 Les règles à respecter lors de la fabrication des doses d'insémination artificielle

Congelées :

Une dose d'IAC doit contenir au minimum **400** millions de spermatozoïdes totaux. Une dose est classiquement composée de **8** paillettes de **0,5** ml chacune, et la concentration en spermatozoïdes est de **100** millions de spermatozoïdes par millilitre. (**BARRIER-BATTUT I., et al, 2014**)³³.

Pour exploiter un étalon en IAC, ses éjaculats doivent présenter un pourcentage de spermatozoïdes mobiles après décongélation supérieur à **35%**. Un système pour harmoniser les doses d'insémination congelées commercialisées en France, selon les normes des Haras Nationaux. Ce système, présenté dans le (tableau 4) permettrait de mieux garantir la qualité des doses commercialisées (**Vidament, 2005**)³.

Tableau 4 : Classification de la qualité des doses de sperme congelé proposée par (Vidament, 2005)³ (PONTHIER J., & AL 2014)³¹.

CRITERE	INDICE	DEFINITION
Nombre de spermatozoïdes pour la saison	A***	> 3x750x10 ⁶ soit 2,25 x10 ⁹ spermatozoïdes pour 3 cycles
	A**	> 2x750x10 ⁶ soit 2,25 x10 ⁹ spermatozoïdes pour 2 cycles
	A*	> 1x750x10 ⁶ soit 2,25 x10 ⁹ spermatozoïdes pour 1 cycle
	B	Autres offres ou non spécifié
% de mobilité rapide en décongélation	A	> 35%
	B	< 35% ou non spécifié
% de glycérol dans la paillette	A	< 4%
	B	> 4% ou non spécifié

Un indice, représenté par une lettre, est attribué à chacun des trois critères : l'indice A***AA représente la qualité idéale, alors que l'indice BBB est la moins bonne.

5-5-2 Les étapes de la congélation de la semence équine :

Dans le monde, il existe actuellement quatre techniques principales de congélation de la semence équine. Elles comportent globalement les mêmes étapes, dont l'enchaînement peut légèrement varier (BARRIER-BATTUT I., et al, 2014)³³. La technique utilisée en France est une adaptation de celle mise au point par Palmer décrite en 1984, et résumée dans le schéma ci-dessous

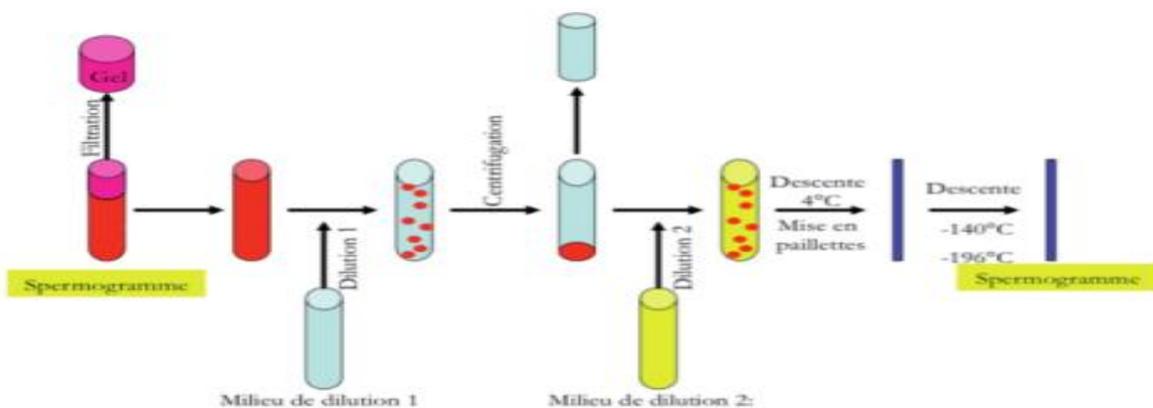


Figure 5 : Le processus de congélation de la semence équine (PONTHIER J., VAN DEN BERGHE F, 2014)³¹

Cette technique comprend la dilution de la semence, en deux étapes successives avec deux dilueurs de composition différente (le second contenant du glycérol) séparées par une centrifugation, un premier refroidissement suivi du conditionnement en paillettes puis la congélation.

a) La première dilution :

Immédiatement après la récolte, l'éjaculat est filtré sur gaze, et sa concentration est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre.

La semence est diluée avec un premier dilueur D1 préalablement placé au bain-marie à **+35°C**. D1 est également appelé le dilueur de centrifugation. Selon les protocoles, il peut être composé du milieu INRA 82[®] additionné de **2%** de jaune d'œuf, ou de lait écrémé UHT additionné d'antibiotiques, ou encore actuellement de l'INRA 96[®].

Pour un éjaculat normalement concentré, le taux de dilution est de $\frac{1}{4}$ de sperme pour $\frac{3}{4}$ de dilueur, sans jamais dépasser les **2,5** milliards de spermatozoïdes par pot.

b) La première descente en température (de + 37°C à + 22°C) :

La préparation est placée au bain-marie à **+22°C** durant **10** minutes.



Figure 6 : mettre la semence dans un bain-marie a 22°C (PONTHIER J., VAN DEN BERGHE F, 2014)³¹.

c) L'élimination du plasma séminal :

Cette étape permet la concentration du sperme et la réduction des effets néfastes du plasma séminal. En effet des études ont permis de montrer les effets délétères de l'exposition prolongée des spermatozoïdes au plasma séminal : la mobilité des spermatozoïdes postcongélation est meilleure lorsque l'échantillon est incubé, avant congélation, avec **5%** de plasma séminal, en comparaison aux échantillons en contenant **20%**. Le contact prolongé avec le plasma séminal réduit donc le pouvoir fécondant des spermatozoïdes après décongélation, car l'environnement auxquels ils sont soumis est inapproprié, d'où l'intérêt de l'étape d'élimination du plasma séminal dans les protocoles de congélation de la semence équine.

Plusieurs techniques sont décrites dans la littérature pour éliminer le plasma séminal :

- Par récolte à vagin ouvert, pour ne collecter que la fraction de l'éjaculat riche en spermatozoïdes.

- Par centrifugation de l'éjaculat.

L'option retenue en France est la centrifugation de l'éjaculat à température ambiante, pour éliminer totalement le plasma séminal. La semence est centrifugée pendant **10** minutes à **600** x g, puis le surnageant (composé de dilueur D1 et de plasma séminal) est enlevé par aspiration.

Lors de la centrifugation, une perte importante en spermatozoïdes est déplorée : **20** à **50%** des spermatozoïdes peuvent ainsi être éliminés dans le surnageant. De récents dispositifs que nous développerons plus loin permettent d'améliorer les résultats de cette étape.

d) La seconde dilution :

Cette seconde dilution permet d'apporter le cryoprotecteur (le glycérol), et d'obtenir une concentration finale de **100** millions de spermatozoïdes par ml.

Le diluant de congélation D2 aura été préalablement réchauffé au bain-marie à **+ 22°C**.

Il est ajouté en deux fois successives au culot de spermatozoïdes en suspension, séparées par une étape de mesure de la concentration du sperme à la cellule hématimétrique de façon à adapter précisément le volume de D2 ajouté.

e) La seconde descente en température (de +22°C à +4°C) suivie du conditionnement en paillettes :

Les tubes de semence diluée sont bouchés puis placés à + 4°C pendant **1 heure 20** minutes.

L'équilibration consiste à laisser incuber la semence avec le diluant de congélation avant d'effectuer la congélation des doses. Cette étape permet de stabiliser l'équilibre osmotique entre le milieu extracellulaire et intracellulaire, donc permet la pénétration du glycérol à l'intérieur des spermatozoïdes.

Le matériel nécessaire à la mise en paillette est placé à + 4°C, et l'enceinte de congélation est préparée, ainsi que le jonc d'identification. Les paillettes de **0,5 ml** préalablement identifiées sont remplies soit manuellement soit à l'aide d'une machine à remplir et à souder les paillettes, puis placées sur la rampe de congélation.

La paillette la plus fréquemment utilisée est la paillette Cassou, dont une extrémité est obstruée par deux tampons de coton entre lesquels se trouve de la poudre d'alcool polyvinylique (l'ensemble devient étanche au contact d'un liquide), et l'autre extrémité est fermée soit par soudure, soit en la trempant dans de la poudre d'alcool polyvinylique.

L'opérateur veillera à ne pas attraper les paillettes à mains nues en leur milieu, pour éviter d'éventuelles variations de températures.



Figure 7 : Phase d'équilibration de la semence a 4°C (PONTHIER J., VAN DEN BERGHE F, 2014)³¹.

f) La congélation des paillettes (de + 4°C à – 196°C) :

Deux dispositifs permettent la congélation des paillettes :

Soit en adaptant la hauteur des paillettes au-dessus du niveau d'azote liquide dans un récipient contenant de l'azote liquide. Placer les paillettes pendant **10** minutes à **4** cm au-dessus du niveau d'azote liquide. Les plonger ensuite dans le gobelet d'azote, et placer le gobelet dans la cuve de stockage remplie d'azote. Chaque gobelet contient un éjaculat.

Soit en utilisant un congélateur programmable, réglé avec une vitesse de refroidissement de – **60°C** par minute entre **+ 4** et – **140 °C**.

Le contrôle de qualité consiste ensuite à observer au microscope **3** paillettes de chaque éjaculat, pour évaluer la mobilité des spermatozoïdes après décongélation.

g) La décongélation des paillettes :

L'étape de décongélation de la semence est une phase importante dans la préservation de la survie des spermatozoïdes (**BARRIER-BATTUT I., et al, 2014**)³³.

La vitesse de décongélation dépend de la vitesse de congélation des paillettes.

Les **8** paillettes sont sorties de la cuve d'azote liquide à la pince, et rapidement plongées dans un bain-marie à **+ 35°C** pendant **30** secondes.

Les **8** paillettes sont sorties du bain-marie en deux séries successives de **4**, essuyées et vidées dans un tube. Après agitation, la dose est aspirée dans un cathéter d'insémination artificielle et utilisée dans les **3** minutes. Un contrôle de la qualité est effectué au microscope sur une goutte de la dose.

5-6 Rôle et caractéristique du dilueur :

Isotonicité : pour ne pas perturber les conditions osmotiques des spermatozoïdes. PH et Pouvoir tampon : pH optimal se situe au niveau de la neutralité, et aussi a un pouvoir tampon pour éviter l'acidité causée par l'activité métabolique des spermatozoïdes.

Pouvoir nutritif : il contient des substances nutritives pour maintenir la survie des spermatozoïdes.

Pouvoir antioxydants : contre les radicaux libres.

Action stabilisante : comme le j'aune d'œuf protège les spermatozoïdes.

Action protectrice : contre les cristaux formés lors de la congélation.

Action antibactérienne : contient des antibiotiques.

5-6-1 Les principaux diluants employés dans l'espèce équine :

Les principaux milieux de dilution de la semence utilisés dans l'espèce équine sont présentés ici. Il s'agit soit de préparations commerciales, soit de milieux à préparer. Le choix du milieu employé dépend de la durée de conservation souhaitée de la semence, du coût et de considérations pratiques (aboutissant au choix de fabriquer le milieu de dilution ou d'en acheter un prêt à l'emploi).

a) Les diluants de réfrigération :

Les principaux diluants de réfrigération employés dans l'espèce équine sont le lait demiécrémé additionné d'antibiotiques, l'INRA 96[®] et le KENNEY[®].

Le diluant KENNEY[®] n'est pas commercialisé : il faut compter **5 à 10** minutes pour le préparer. Il peut être additionné d'antibiotiques.

Tableau 5 : Composition du diluant de KENNEY[®] pour 1 L (Préparation simplifiée par l'utilisation de glucose isotonique) (BARRIER-BATTUT I. & AL 2014)³³.

Composants	Quantité
Lait écrémé en poudre	6,1 g
Soluté isotonique de glucose 5%	250 mL
Volume total, une fois la poudre de lait dissoute	255 mL

Tableau 6 : Composition chimique du dilueur INRA 96[®] (PILLET E, 2009).

Composants	Quantité (g/L)
Glucose	13,21
Lactose	45,39
Hépès	4,76
Eau déminéralisée	Qsp 1L
PPCN	27
Dichlorure de calcium	0,14
Chlorure de potassium	0,4
Phosphate de potassium	0,06
Sulfate de magnésium	0,2
Chlorure de sodium	1,25
Phosphate disodique	0,118
Bicarbonate de sodium	0,35
Citrate disodique	1,12

Ce dilueur est commercialisé prêt à l'emploi, et contient déjà des antibiotiques et un antifongique. Sa composition est chimiquement définie, et il contient une concentration en micelles de caséines deux fois supérieure à celle du milieu INRA 82[®]. De plus ces caséines sont présentes sous leur forme native dans le milieu INRA 96[®], représentée par une fraction purifiée de caséines : la phosphocaséine native.

b) Les diluants de congélation :

Les principaux diluants de congélation employés dans l'espèce équine sont l'INRA 82-Hépès Additionné de jaune d'œuf, de glycérol et d'antibiotiques, l'INRA 96[®] également additionné de jaune d'œuf et de glycérol, le milieu lactose-EDTA, le KENNEY[®] modifié, le BOTUCRIO[®] et le milieu INRA-Freeze[®].

La fabrication du diluant de congélation à partir du milieu INRA 82 – Hépès[®] dure une heure et demi. 2% de jaune d'œuf centrifugé et 2,5% de glycérol sont ajoutés au milieu de base. La même fabrication est réalisable à partir du milieu INRA 96[®] (BARRIER-BATTUT I., et al, 2014)³³.

Le Botucrio[®] et l'INRA-Freeze[®] sont commercialisés prêts à l'emploi.

Une étude publiée en 2007 compare les résultats de fertilité obtenus avec de la semence équine congelée avec le milieu INRA 96[®] et le milieu INRA 82[®], tous les deux additionnés de **2%** de jaune d'œuf et de **2,5%** de glycérol. Deux expérimentations ont été effectuées successivement :

Des analyses in-vitro ont porté sur les paramètres de mobilité des spermatozoïdes après décongélation, et sur l'intégrité de leur membrane plasmique. Les résultats du test d'intégrité membranaire étaient en faveur du milieu INRA 96[®], tandis que ceux de mobilité des spermatozoïdes étaient en faveur du milieu INRA 82[®]. Ces résultats sont cohérents avec la littérature. Les paramètres de mobilité ne reflètent par la fertilité potentielle de la semence : aucune hypothèse n'est pour le moment avancée pour expliquer cela. Les essais de fertilité ont porté sur **84** cycles. Les taux de fertilité par cycle obtenus étaient de **71%** avec le milieu INRA 96[®] et de seulement **40%** avec le milieu INRA 82[®].

Le milieu INRA 96[®], développé en 1997, est donc un milieu de composition chimiquement défini qui permet de maintenir le pouvoir fécondant des spermatozoïdes tant lors du processus de réfrigération que lors de celui de congélation de la semence équine.

5-7 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) (Pillet et al, 2011, 2012)³⁴.

a) 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)³⁴.

b) Les cryoprotecteurs pénétrants :

Comme le glycérol, le diméthyl sulfoxyde (DMSO) (Gilmore et al., 2000)³⁵ ou les amides (Alvarenga et al., 2005)³⁶ : 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)³⁷.

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**)³² (**Ponthier et al, 2014**)³¹.

5-8 Les agents antioxydants :

La sensibilité apparente des spermatozoïdes équins au stress oxydatif a stimulé l'intérêt pour l'utilisation d'antioxydants pour contrecarrer ce processus, en tant qu'aide à la fertilité in vivo et in vitro. En outre, il est important de restaurer des niveaux optimaux d'antioxydants dans le sperme en les ajoutant au prolongateur. Une variété d'antioxydants a été utilisée pour prolonger la durée de vie des spermatozoïdes d'étalon dans diverses circonstances. Plusieurs essais ont été réalisés chez divers mammifères sur l'effet de l'ajout de vitamine E (α -tocophérol) (**Contri A, et al ; 2011**)³⁸ et de vitamine C (acide ascorbique) (**Ball BA, et al ; 2001**)³⁹ dans des extensions de congélation dans le but d'améliorer la qualité du sperme, mais des résultats incohérents ont été observés jusqu'à présent concernant la cryoconservation des spermatozoïdes d'étalons. Un effet positif de l'ajout d'acide ascorbique sur la préservation de l'intégrité membranaire du sperme équin refroidi a été observé (**Aurich JE, et al ; 1997**)⁴⁰. Selon (**Agüero A, et al ; 1995**)⁴¹, l'ajout de vitamine E avant le stockage du sperme refroidi (5°C) exerçait un effet protecteur sur la membrane plasmique et maintenait la motilité progressive, indépendamment de la présence ou de l'absence de plasma séminal. Néanmoins, (**Baumber j, et al ; 2005**)⁴² ont observé que l'ajout d' α -tocophérol et d'acide ascorbique à l'extenseur de cryoconservation n'améliorait pas la qualité des spermatozoïdes équins après décongélation ; ne parvenant pas à démontrer un effet clair et positif sur le maintien de la motilité ou de la fertilité des spermatozoïdes pendant le stockage liquide. Néanmoins, l'évaluation de la capacité antioxydante totale du plasma séminal suggère que l'acide ascorbique et l' α -tocophérol pourraient constituer l'essentiel de la capacité antioxydante du sperme (**Thiele JJ, et al ; 1995**)⁴³. On pense que la vitamine E ou α -tocophérol est le principal composant du système antioxydant des spermatozoïdes, et elle est considérée comme le principal protecteur membranaire contre les ROS et la LPO membranaire (**Agarwal A, et al ; 2003**)⁴⁴. Cet antioxydant de faible poids moléculaire peut inhiber la réaction de la LPO dans la membrane en éliminant le peroxyde (ROO), l'alcoxyde (RO) et d'autres radicaux dérivés des lipides (**Silva PFN. 2006**)⁴⁵. De plus, la vitamine E peut être recyclée pour fonctionner à nouveau, même lorsque sa concentration

est faible. Cet antioxydant à petites molécules est un antioxydant briseur de chaîne et non un antioxydant piègeur présent dans la membrane cellulaire du sperme **(Dad S, et al ; 2006)**⁴⁶, et agit en neutralisant H₂O₂ et en éteignant les radicaux libres, stoppant ainsi les réactions en chaîne qui produisent des peroxydes lipidiques et protégeant la membrane des dommages. Induit par les ROS **(Agarwall A, et al ; 2014)**⁴⁷. La capacité de l' α -tocophérol à maintenir un taux stable de réduction des radicaux peroxydes dans la membrane plasmique dépend du recyclage de l' α -tocophérol par des agents réducteurs externes tels que l'ascorbate ou les thiols **(Moreira da Silva F, et al ; 2010)**⁴⁸. De plus, il améliore l'activité d'autres oxydants piègeurs, contribuant ainsi à préserver à la fois la motilité et la morphologie des spermatozoïdes **(Agarwal A, et al ; 2004)**⁴⁹. L'acide ascorbique (vitamine C) est un antioxydant brise-chaîne qui joue un rôle important (jusqu'à 65 %) dans la lutte contre le stress oxydatif dans le plasma séminal. Il s'agit d'un piègeur de radicaux libres d'origine naturelle et, en tant que tel, sa présence contribue à divers autres mécanismes dans la diminution de nombreux processus perturbateurs de radicaux libres, notamment la LPO **(Knight JA, et al ; 1993)**⁵⁰. Il réagit avec OH⁻, O₂ et H₂O₂ dans le liquide extracellulaire, protégeant ainsi la viabilité et la motilité des spermatozoïdes **(Agarwal A. et al; 1996)**⁵¹.

CHAPITRE 02 : LE TRANSFERT EMBRYONNAIRE

1-Rappel Anatomique de l'appareil génital de la jument (BARONE, 1978)⁶³ :

L'appareil génital de la femelle a pour rôle, d'une part l'élaboration des gamètes et des hormones sexuelles, et d'autre part d'être le siège de la fécondation, de la gestation et de la mise bas. L'appareil génital peut être divisé en trois grandes parties selon leur fonction (figure 8).

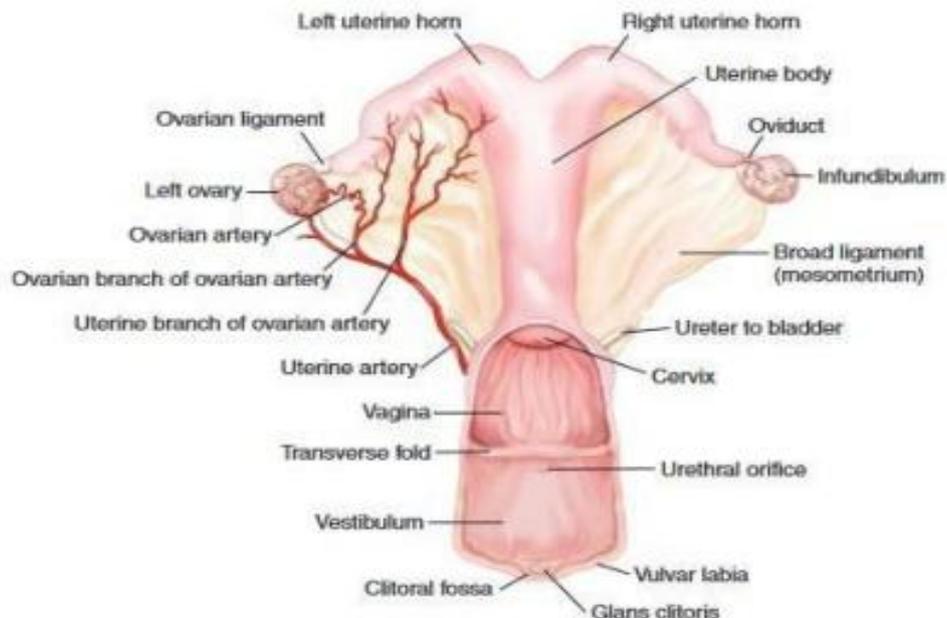


Figure 8 : Vue dorsale de l'appareil reproducteur de la jument (Brinsko et al., 2011)¹⁴.

- **la section glandulaire** : constituée par les ovaires qui produisent les ovocytes et différentes hormones.
- **la section tubulaire** : constituée par les voies génitales proprement dites, et qui présente trois étages : les trompes utérines captent les ovocytes et sont le siège de la fécondation ; l'utérus reçoit l'œuf fécondé permet la mise en place du placenta puis le développement foetal ; enfin le col de l'utérus et le vagin séparent le corps de l'utérus du sinus uro-génital.
- **le sinus uro-génital** : est constitué du vestibule du vagin et de la vulve, qui permettent de recevoir le pénis de l'étalon lors de la saillie ainsi que le passage du nouveau-né lors de la mise bas.

1-1 Le sinus uro-génital :

La vulve est la partie la plus postérieure du tractus génital et occupe la partie ventrale du périnée. Les deux lèvres de la vulve délimitent la fente vulvaire médiane, et sont relativement minces. Leur peau est fine, très pigmentée et presque dépourvue de poils. La commissure dorsale est étroite et aiguë tandis que la commissure ventrale, située 5 à 6 cm ventralement à l'arcade ischiatique est plus large et plus arrondie (figure 9).

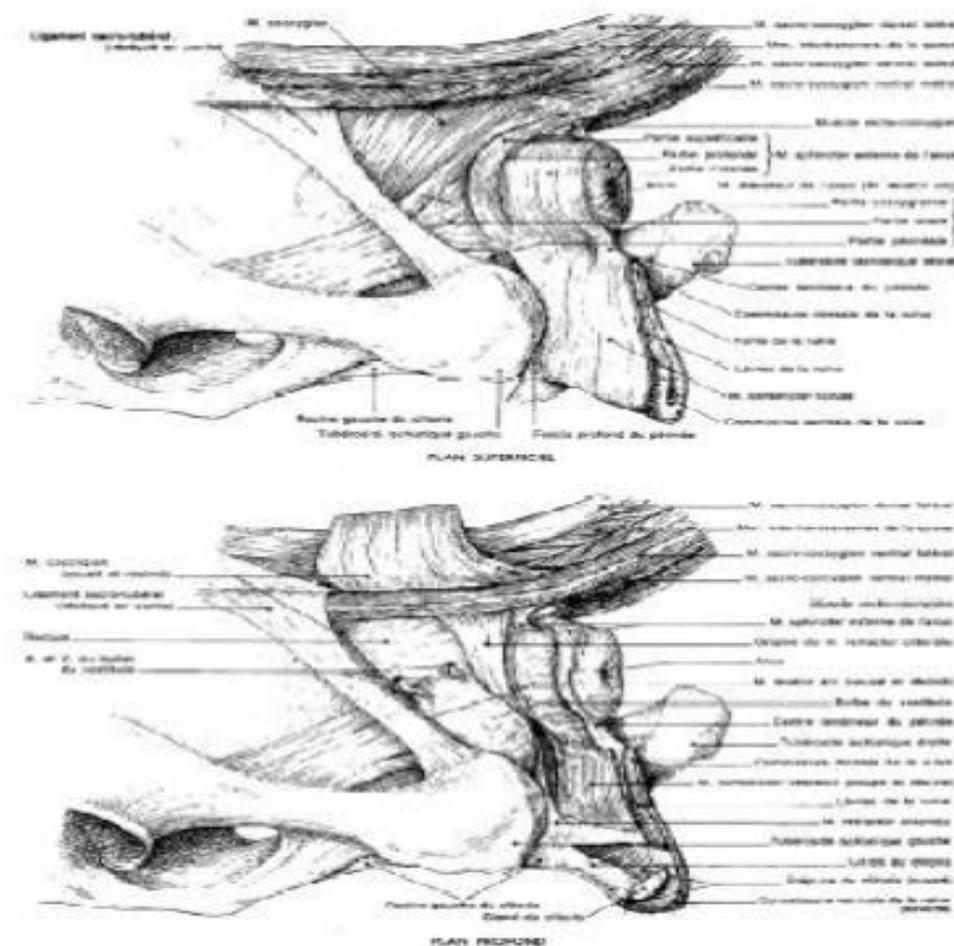


Figure 9 : Sinus urogénital de la jument (BARONE 1978)⁶³.

Le clitoris mesure 7 à 9 cm de long, et son gland est visible dans la fosse clitoridienne, profonde de 1 à 2 cm, à la commissure ventrale des lèvres de la vulve.

Le vestibule du vagin est un conduit long de **10 à 15** cm, et haut de **4 à 6** cm à l'état de repos, incliné ventro-caudalement. Il est tapissé d'une muqueuse formant des plis longitudinaux peu élevés.

L'ostium externe de l'urètre s'abouche au plancher du vestibule à une douzaine de centimètres crânialement à la commissure ventrale de la vulve. Il a l'aspect d'une fente transversale et est très dilatable. Le vestibule du vagin possède à sa limite caudale un bulbe érectile pair, bien net et fort. Ce bulbe est haut de **5 à 6** cm, large de **3** cm, et épais d'un centimètre environ. Son extrémité dorsale est arrondie, relativement large. L'extrémité ventrale s'incurve en direction caudale pour rejoindre son homologue du côté opposé.

L'ensemble forme **l'anneau vestibulaire**, qui assure une fermeture assez efficace des voies génitales postérieures.

1-2 Le vagin :

Le vagin s'étend du col de l'utérus à l'anneau vestibulaire. C'est un organe tubulaire de **20 à 25** cm de long en moyenne. Ses parois sont relativement minces et distensibles. En effet, le diamètre extérieur du vagin à l'état vacuitaire est de **3 à 5** cm dorso-ventralement, pour **6 à 9** cm transversalement, mais ses possibilités de dilatation ne sont limitées que par le squelette de la ceinture pelvienne qui l'entoure. L'extrémité crâniale du vagin vient s'insérer autour du col utérin en ménageant autour de la portion vaginale de celui-ci un cul-de-sac circulaire : le fornix du vagin, régulièrement annulaire, et de profondeur à peu près égale partout.

L'extrémité caudale, généralement plus étroite, est en relation avec le vestibule du vagin. Cette communication constitue l'ostium du vagin. Son pourtour est marqué par un vestige du tubercule sinual qui constitue l'hymen, cloison bien développée chez **80%** des jeunes pouliches, et parfois même imperforée chez quelques-unes.

La plus grande partie du vagin est logée dans le conjonctif du bassin. Sa face dorsale répond au rectum par l'intermédiaire du mince fascia recto-vaginal. Sa face ventrale est en contact avec la vessie et l'urètre. Les uretères le croisent de part et d'autre au voisinage de l'entrée du bassin. Le tiers crânial du vagin est tapissé par le péritoine, qui s'enfonce entre le vagin et

le rectum pour former le cul-de-sac recto-génital, et entre d'une part le vagin et l'utérus et d'autre part la vessie, pour former le cul-de-sac vésico-génital. Ces deux culs-de sac sont complètement séparés l'un de l'autre par l'insertion du ligament large de part et d'autre du vagin. Le vagin est fixé crânialement par son insertion autour du col de l'utérus et par le péritoine. Caudalement il est relié par continuité à son vestibule, qui le solidarise à la vulve (figure 10).

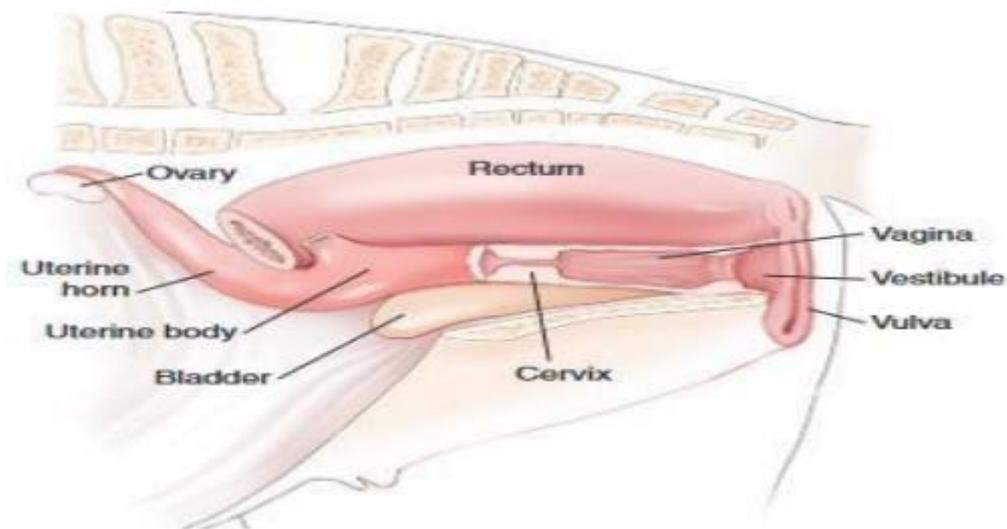


Figure 10 : Vue latérale de l'appareil reproducteur de la jument et des structures adjacentes (Brinsko et al., 2011)¹⁴.

1-3 Le cervix :

Le col de l'utérus est constitué par un très fort épaissement de la paroi du tractus génital entre le corps de l'utérus et le vagin, qui atteint **30 à 35 mm** d'épaisseur. Il délimite le canal cervical, rectiligne, long de 5 à 8 cm, tapissé d'une muqueuse plissée longitudinalement. L'ostium interne du canal cervical forme un court infundibulum représentant l'isthme. L'ostium externe est porté au sommet d'une portion vaginale saillante de **3 à 4 cm** et circonscrite par un fornix du vagin formant un cul de sac annulaire et régulier. Les plis épais, peu saillants et peu festonnés dans le canal cervical se réfléchissent sur le revers vaginal de cette saillie en se multipliant et se subdivisant tout en s'amincissant. Cet ensemble est couramment dénommé « fleur épanouie ».

La portion vaginale est brève et à peine plissée avant la puberté où l'ostium externe de l'utérus a l'aspect d'une fente transversale. A la puberté, l'ostium devient circulaire en

même temps que sa bordure s'épaissit beaucoup et se plisse. La morphologie du col varie de façon remarquable au cours des cycles sexuels. Dans les périodes de repos, cet organe est dur, complètement fermé, de teinte pâle. Il commence à ramollir dans le proœstrus. Au moment de l'oestrus, il est devenu moins saillant, relâché et mou, et comme affaissé sur le plancher vaginal. On peut aisément y introduire un puis deux doigts en même temps que ces plis deviennent bas, noyés dans un mucus épais et abondant. Il est alors très coloré, congestionné et rougeâtre. Vers le moment de l'ovulation, il est très sensible et présente une alternance de contraction et de relâchements. Ces phénomènes rétrocedent rapidement dans le metœstrus : trois ou quatre jours après l'ovulation, le col, encore coloré et un peu épaissi, est déjà presque totalement fermé et beaucoup moins souple. Il a repris totalement ses caractères de repos au bout de **8 à 10** jours. Le col est en contact dorsalement avec le rectum et ventro-caudalement avec la vessie. Il n'est pas rare de retrouver des anses intestinales interposées, étant donnée la profondeur des culs-de-sac péritonéaux (figure 11).

1-4 L'utérus :

L'utérus est l'organe de gestation. C'est un viscère creux, pourvu d'une muqueuse riche en glandes et d'une musculature puissante. Il est appendu de chaque côté à la région lombaire par un fort méso, le ligament large. Chez la jument, l'utérus est de type bicornal: le corps est bien développé et a peu près aussi long que les cornes. La forme générale de l'utérus représente une sorte de T ou de Y. Il est long d'une quarantaine de centimètres, dont **5 à 8** pour le col, **14 à 24** pour le corps, et **12 à 20** pour les cornes. Le corps est large de **6 à 8** cm et les cornes de **5 à 6** cm. L'organe isolé pèse en moyenne **800** grammes.

Les cornes utérines sont cylindroïdes, un peu convexes ventralement (bord libre ou grande courbure) et concaves par leur bord mésométrial (ou petite courbure, donnant insertion au ligament large) qui est dorsal. Leur sommet ou apex est voisin de l'ovaire et reçoit la trompe utérine. Il est à peu près hémisphérique et très nettement délimité, ce qui donne en son milieu une implantation nette à la trompe utérine. La base des cornes délimite avec celle de la corne opposée un étroit fundus qui forme une limite précise au corps de l'utérus. Le corps de l'utérus est cylindroïde, nettement aplati dans le sens dorso-ventral, ce qui permet de lui reconnaître deux faces, deux bords, ainsi que deux extrémités. La face dorsale et la face ventrale sont lisses et convexes d'un côté à l'autre. Les bords, à droite et à gauche, donnent

attache à la partie caudale du ligament large et prolongent ainsi le bord mésométrial des cornes. L'insertion du ligament large est plus proche de la face dorsale que de la face ventrale. L'extrémité caudale du corps de l'utérus se prolonge par le col de l'utérus.

Les rapports et la topographie de l'utérus sont surtout déterminés par la disposition de l'intestin et la situation haute des ovaires. Le col est placé entre le rectum et la partie crâniale de la vessie et seule la moitié caudale ou le tiers du corps utérin sont dans la cavité du bassin. Comme les culs de sac correspondants du péritoine sont profonds et atteignent le vagin, il n'est pas rare de trouver des anses jéjunales interposées entre ces parties de l'utérus et le rectum, ou la courbure pelvienne du gros côlon entre leur face ventrale et la vessie. Les cornes utérines flottent parmi les circonvolutions du jéjunum et du petit colon et entrent en contact avec la base du caecum. Souvent, les viscères intestinaux le plaquent contre la paroi lombaire ou la partie adjacente des flancs. L'apex de chacune des cornes utérines est situé au niveau de la quatrième ou cinquième vertèbre lombaire, **15 à 20** millimètres ventrocaudalement à l'ovaire correspondant (figures 11).

Chaque ligament large est long, inséré au voisinage du rein, en regard de la troisième vertèbre lombaire, jusqu'au fond du bassin, en convergeant caudalement vers le méso-rectum. Il est riche en faisceaux de fibres musculaires lisses. Son bord ventral est assez régulièrement convexe et son insertion s'étend caudalement jusque sur le vagin. Son extrémité crâniale est presque deux fois plus ample que l'extrémité caudale ; sa bordure est nettement renforcée par le ligament suspenseur de l'ovaire. Le ligament rond de l'utérus est bien visible à la face latérale du ligament large. Il commence un peu dorsalement à l'apex de la corne, où il détache un appendice arrondi, plus ou moins long et flottant. Son étroit méso s'efface rapidement en direction caudale. L'extrémité caudale du ligament lui-même se perd dans le conjonctif sous-péritonéal au voisinage de l'anneau inguinal profond ; elle se continue dans certains sujets jusque dans l'espace inguinal (figure 11).

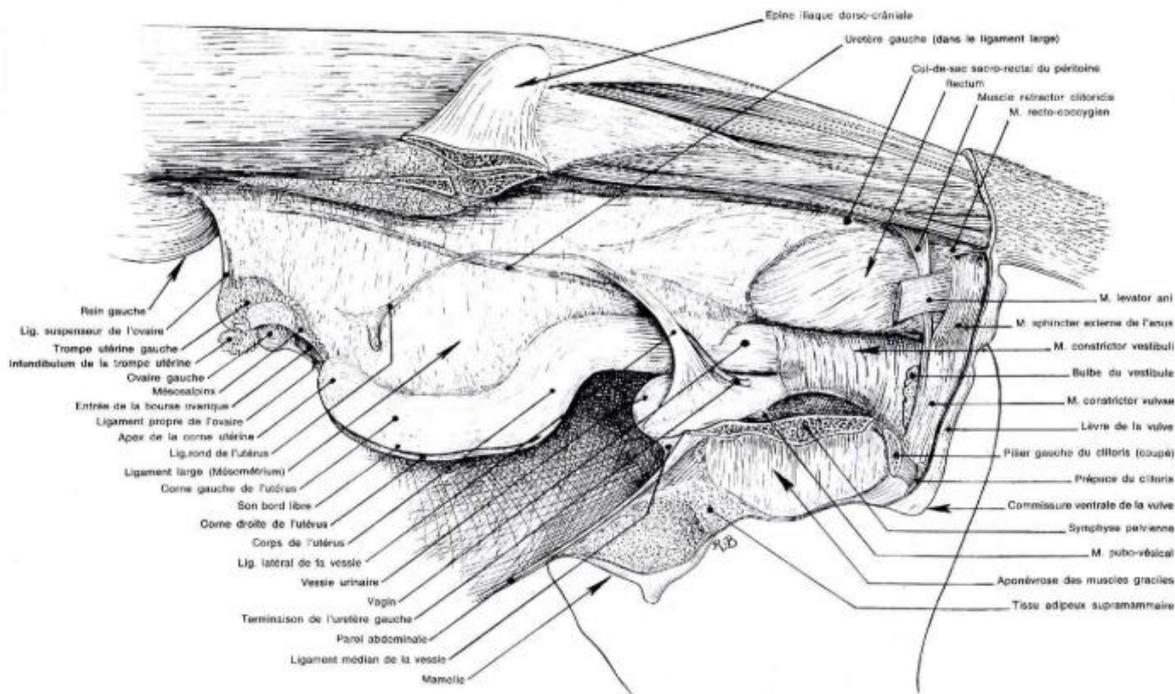


Figure 11: APPAREIL GÉNITAL ET ORGANES PELVIENS D'UNE JUMENT (BARONE 1978)⁶³.

1-5 Les trompes utérines :

La trompe utérine ou salpinx est un conduit étroit qui reçoit les ovocytes libérés par l'ovaire, abrite la fécondation et assure le transfert du zygote et des embryons en cours de clivage puis de développement jusqu'à l'utérus (jusqu'au stade blastocyste). Chez la jument, ce conduit est long de **20 à 30 cm**, mais étant pelotonné, ses flexuosités réduisent le trajet à une dizaine de cm. Les trompes utérines ont un diamètre de **5 à 9 mm** au début de l'ampoule et se réduit à **2 à 3 mm** près de l'utérus. Le conduit ne s'avance pas au-delà de l'ovaire, mais décrit seulement un arc de cercle à sa face latérale. L'ampoule est large et son intérieur est encombré de plis tubaires nombreux, hauts et compliqués. Elle se rétrécit peu à peu et il n'y a pas de démarcation précise avec l'isthme, qui devient très étroit vers sa terminaison. L'ensemble est très flexueux, mais les sinuosités, amples au niveau de l'ampoule, où elles s'adosent à leurs voisines, deviennent de plus en plus lâches et faibles en approchant de l'utérus (figure 12).

La partie utérine (qui s'ouvre dans la cavité utérine par l'ostium utérin) décrit une ou deux flexuosités serrées dans l'épaisseur de la paroi utérine et l'ostium utérin est portée au sommet d'un petit tubercule rigide. L'ouverture de la trompe utérine au niveau de la corne

utérine est appelée papille uterotubaire. Cette partie de la trompe utérine est proche de l'utérus, souvent appelée jonction uterotubaire, joue le rôle de réservoir pour les spermatozoïdes. Elle contribue à la sélection de quelques milliers de spermatozoïdes. C'est également à cet endroit qu'a lieu la capacitation des spermatozoïdes. Placé latéralement à l'ovaire, la trompe utérine en partage les moyens de fixité et les rapports. Il est solidarisé à cette glande, à l'utérus et au ligament large. L'infundibulum de la trompe utérine est uni à l'ovaire par la fimbria ovarica. Celle-ci forme la bordure du mésosalpinx entre les deux organes. Elle est revêtue sur sa face ovarique par la muqueuse tubaire, et sur sa face opposée par le péritoine, renforcé de travées de fibres de collagène et musculaires lisses. Dans tout son parcours, la trompe utérine est portée par le mésosalpinx, qui constitue la paroi latérale de la bourse ovarique (figure 12).

1-6 Les ovaires :

Les ovaires représentent les glandes génitales de la femelle. Ils ont pour fonctions l'ovogénèse et la sécrétion endocrine par leur production d'hormones régulant l'activité génitale. Les ovaires ont une forme de haricot, mais leur taille et leur forme varient avec la race, l'âge des sujets, la saison et la période du cycle. Ils mesurent environ **7** cm sur **4** et pèsent en moyenne **60** grammes avec des variations de **20** à **170** grammes. La conformation de l'ovaire est caractéristique chez la jument : schématiquement, sur une coupe frontale, l'ovaire de la jument a une disposition particulière, inverse de celle des autres espèces. En effet, la medulla est externe et le cortex est interne et ne communique avec l'extérieur qu'au niveau de l'épithélium germinatif dans la fosse d'ovulation (figure 12).

La fosse d'ovulation forme une encoche profonde au niveau du bord libre, qui est ventro-crânial. Elle est bordée par une ligne limitante nette et son bord crânial donne attache à une fimbria ovarica large et courte. A l'exception de cette fosse, toute la glande est couverte par le péritoine, qui la rend lisse et blanchâtre. Les extrémités sont arrondies et épaisses, incurvées de part et d'autre de la fosse. L'extrémité tubaire est crâniale, située nettement plus dorsalement et un peu plus latéralement que l'extrémité utérine. Le bord mésovarique dorsocaudal, est régulièrement convexe, dépourvu de hile. Les ovaires sont en général situés en regard de la quatrième ou cinquième vertèbre lombaire, à distance variable du pôle caudal des reins (**5-15** cm) et à **1,5-2** cm de l'extrémité correspondante des cornes utérines.

Le ligament suspenseur de l'ovaire occupe le bord crânial du mésovarium et se porte de la paroi lombaire, où il s'attache au voisinage du rein, à l'extrémité tubaire de l'ovaire.

Le ligament propre de l'ovaire (ligament utéro-ovarique), s'étend de l'extrémité utérine de l'ovaire à l'extrémité correspondante de la corne utérine. C'est la partie libre du bord distal du mésovarium, épaissie par un axe conjonctif dense, mêlé de fibres élastiques et musculaires lisses. Il est particulièrement épais et fort chez la jument.

La fimbria ovarica (ligament tubo-ovarique) est une des franges de l'infundibulum de la trompe utérine, que double le bord correspondant du mésosalpinx et qui s'attache à l'extrémité tubaire de l'ovaire.

La bourse ovarique est délimitée par le mésovarium et le mésosalpinx. Elle résulte en quelque sorte d'un dédoublement du ligament large en regard de l'ovaire.

La structure ovarienne est d'un type particulier. Un stroma dense soutient uniformément tous les autres éléments. Il est fortement fibreux sous le péritoine, c'est-à-dire sur toute la périphérie de l'organe sauf la fosse d'ovulation et l'épaisseur de cette albuginée s'oppose à la déhiscence des follicules ailleurs que dans la fosse. La partie profonde de cette enveloppe loge les principaux vaisseaux. L'albuginée reste au contraire très mince et peu fibreuse au niveau de la fosse d'ovulation, où font défaut les gros vaisseaux. La zone vasculaire, ou medulla est périphérique et très mince, à l'inverse des autres espèces.

Les follicules ovariens ont un devenir variable. Certains s'accroissent régulièrement jusqu'à maturation et déhiscence. Après libération de l'ovocyte, chacun d'eux donne naissance à un corps jaune, glande endocrine temporaire dont la sécrétion prépare le tractus génital à la gestation et se prolonge éventuellement pendant celle-ci. D'autres, beaucoup plus nombreux, interrompent plus ou moins tôt leur évolution et régressent.

Les follicules sont organisés comme dans les autres espèces, mais peuvent se rencontrer en tous les points de l'organe. Les follicules primordiaux et primaires, très nombreux la première année, évoluent et deviennent si rares et petits après la puberté qu'il est plus difficile de les observer. Les follicules secondaires qui ont l'aspect d'une vésicule sphérique emplie de liquide sont peu nombreux sur un même ovaire. Encore appelés follicules vésiculeux, ils sont composés d'un antrum folliculaire rempli de liquide folliculaire, d'une

granulosa, d'un ovocyte primaire qui achève sa croissance, d'une thèque interne et d'une thèque externe.

A maturité, on parle de follicule mûr. Leur diamètre atteint **3 à 5 cm**, leur taille moyenne étant de **45 mm** au moment de l'ovulation (**GINTHER, 1979**)⁵³ de sorte qu'ils s'appliquent d'une part contre l'albuginée des faces ou d'une extrémité, qu'ils déforment et soulèvent, et d'autre part contre la fosse d'ovulation de l'ovaire.

2-Rappels de physiologie de la reproduction de la jument :

2-1 Saisonnalité :

La jument est un animal polyoestrien saisonnier : dans l'hémisphère nord, l'activité sexuelle physiologique de la jument s'étend en moyenne de fin avril à octobre et diffère en cela de la saison administrative qui débute en février et s'arrête en juillet. Il existe une forte corrélation entre l'augmentation de la durée du jour et l'apparition des ovulations. La jument n'ovule pas toute l'année. Il existe une saison ovulatoire qui débute le jour de la première ovulation et se termine le jour de la dernière ovulation. Cette période varie d'un individu à l'autre et pour un même individu d'une année à l'autre. Dans de bonnes conditions d'entretien, on estime que **15-20%** des juments conservent une activité cyclique toute l'année (**BLANCHARD et al., 2003**)⁵⁴. L'espace de temps pendant lequel il n'y a pas d'ovulation constitue la saison anovulatoire ou anoestrus saisonnier.

a) La saison anovulatoire :

La saison anovulatoire s'étend de la dernière ovulation de l'année précédente jusqu'à la première ovulation de l'année suivante. Elle est caractérisée par l'absence d'ovulation, et précède la saison ovulatoire.

C'est une saison évolutive qui comprend trois périodes :

- une période d'inactivité ovarienne : anoestrus profond,
- une période de réveil ovarien : anoestrus superficiel,
- une période de transition vers la cyclicité : oestrus prolongé ou hyperoestrus.

Pendant l'anoestrus profond :

- Les ovaires sont petits avec des follicules inférieurs à **5** mm de diamètre.
- Le col est dur, ferme, facile à individualiser par palpation transrectale.
- L'utérus est atone, flasque, difficile à individualiser.
- Les niveaux de FSH et LH sont bas.

Pendant l'anoestrus superficiel :

- Les ovaires sont plus actifs, avec des follicules de **5** à **30** mm.
- Le col est pale, dur, ferme, facile à individualiser par palpation transrectale.
- L'utérus est peu tonique, mais plus facile à individualiser.
- Les niveaux des FSH sont plus élevés, proches de ceux de la saison ovulatoire.
- Le niveau de LH est bas.

Pendant la phase de transition :

- La jument est en chaleur, de façon plus ou moins marquée. Cette chaleur peut durer **28** à **63** jours avant de se terminer par la première ovulation.
- Les ovaires sont actifs avec des follicules de **5** à **30** mm.
- Le col est plus ou moins rose, plus ou moins relâché, plus souple à la palpation.
- Le niveau de FSH est élevé. Le niveau de LH reste bas jusqu'au moment où son élévation va conduire à la première ovulation.

b) La saison ovulatoire

La saison ovulatoire va de la première à la dernière ovulation de l'année. Elle est rythmique et se caractérise par le cycle oestral.

La durée de l'oestrus est de **6** à **8** jours en moyenne. Elle peut varier selon les animaux de **3** à **12** jours.

L'interoestrus s'étend sur une période plus constante de **12 à 18** jours, avec une moyenne de **15** jours. La somme des deux, correspondant au cycle sexuel, dure en moyenne de **21,5** jours, avec des variations de **18 à 25** (voire à **36**) jours.

La durée de l'oestrus étant très variable, elle est peu fiable pour surveiller le retour des juments en chaleur. Ainsi, pour une même jument, l'oestrus ovulatoire est assez long en début de saison (avril-mai) ; il diminue progressivement et finit par se stabiliser en été et augmenter en automne. Il est donc préférable de prendre en compte la durée de l'interoestrus (beaucoup moins variable) plutôt que la durée totale du cycle. On cherchera donc les manifestations de l'oestrus **15** jours après la fin de l'oestrus précédent.

Pendant l'oestrus, à l'examen transrectal, l'utérus a une consistance flasque, le col de l'utérus est relâché et flasque.

Pendant l'interoestrus, l'utérus est tonique, et le col long, étroit et ferme (**BLANCHARD et al., 2003**)⁵⁴.

La jument revient en chaleur très rapidement après la mise-bas : entre **7 à 12** jours, ce qui constitue une particularité spécifique. Ces chaleurs durent environ 4 jours et leur fertilité est normale.

La programmation de cette chaleur provient de la levée de l'inhibition hypophysaire due à l'arrêt de la sécrétion de stéroïdes (oestrogènes, progestagènes) par l'unité foetoplacentaire. Il y a élévation des niveaux plasmatiques de FSH puis de LH dès le poulinage.

Après cette première chaleur, deux cas peuvent se présenter si la jument n'est pas gravide : il y a soit reprise de la cyclicité ; soit il y a absence de cyclicité, due à la présence d'un corps jaune persistant (dans le cas d'un poulinage tardif) ou due à l'inactivité ovarienne (Anoestrus de lactation).

2-2 Evolution des évènements hormonaux du cycle ovarien :

Pendant le cycle oestral, les évènements se déroulent schématiquement à deux niveaux : au niveau hypophysaire par la sécrétion des gonadotrophines FSH et LH, et au niveau ovarien

par l'alternance d'organites sécrétants temporaires que sont le follicule (sécrétant des oestrogènes) et le corps jaune (sécrétant la progestérone).

a) Evolution au niveau hypophysaire :

Le jour de l'ovulation est noté **J0**. Le taux circulant de LH s'élève dès le début de l'oestrus pour atteindre son sommet **24 à 36** heures après l'ovulation et revient à son minimum à **J5**.

En début de saison, la sécrétion de FSH prend une allure bimodale au cours du cycle oestral. Seul le deuxième pic subsiste en fin de saison. Le taux sanguin de FSH s'élève à partir du **J0** jusqu'au **J3-J4**, passe par un minimum à **J8** pour atteindre à nouveau un deuxième pic à **J13**.

b) Evolution au niveau ovarien :

Au niveau ovarien, la croissance folliculaire s'accompagne d'une augmentation de production oestrogénique, tandis que la mise en place du corps jaune est associée à une prépondérance de la progestérone. de **J0** (jour de l'ovulation) à **J5**, on assiste à la mise en place du corps jaune, structure qui sécrète la progestérone, de **J5 à J13**, le corps jaune est actif, et la sécrétion de progestérone atteint un plateau, de **J13 à J17**, en l'absence de signal embryonnaire, l'utérus sécrète une prostaglandine : $PGF2\alpha$ qui entraîne la lyse du corps jaune et la sécrétion de progestérone devient minimale en **48h à J17**, c'est le début de l'oestrus ; le plus gros des follicules préovulatoires (qui se sont développés de **J10 à J17** sous l'effet de la FSH) continue seul sa croissance et la sécrétion des oestrogènes, dont le niveau est maximum juste avant l'ovulation. Les autres follicules préovulatoires (recrutés entre **J10** et **J17** sous l'effet de la FSH) s'atrophient.

L'ovulation aura lieu grâce à l'élévation du taux de sécrétion de LH.

2-3 La croissance folliculaire :

Chez la jument, la croissance folliculaire normale est linéaire. Le diamètre du follicule croît à la vitesse de **3 à 3,5** mm par jour. Ce diamètre reste à une valeur plateau pendant quelques jours puis décroît **2** fois moins vite, c'est à dire **1,5** mm par jour. On perçoit ainsi un follicule dégénératif deux fois plus longtemps que pendant sa croissance. Il faut savoir que la population folliculaire évolue par vagues où il y a simultanément croissance de follicules et décroissance de follicules atrophiques.

La palpation transrectale et l'échographie mettent en évidence, sur un ovaire d'une jument cyclée, un certain nombre de follicules de taille et de consistance variables, suivant le cycle, associés ou non à un corps jaune. Afin de déterminer le stade du cycle d'une jument, il est important de recenser le nombre et la taille des follicules, ainsi que leur évolution, lorsque l'on procède à l'examen de la jument en reproduction.

2-4 L'ovulation :

C'est le moment de l'ovulation que, par déhiscence folliculaire, l'ovocyte va quitter le follicule pour être récupéré par le pavillon qui va le conduire vers la trompe utérine où aura lieu la fécondation. Le follicule mesure en moyenne **40 à 45** mm au moment de l'ovulation (**30-70** mm). Il est d'une importance capitale de bien diagnostiquer le moment de l'ovulation si on veut améliorer les chances de fécondation. En effet, l'ovocyte a une survie très brève, de **6 à 12** heures, et les spermatozoïdes survivent en moyenne **24 à 48** heures. Pour améliorer la fertilité par chaleur, le vétérinaire se doit d'essayer de prédire l'ovulation de façon à programmer l'insémination artificielle avant et le plus près possible de l'ovulation.

En conséquence, il est nécessaire de pratiquer des examens fréquents pendant l'oestrus l'idéal étant des examens quotidiens, voire biquotidiens, comme cela est pratiqué lors d'utilisation de sperme congelé pour l'insémination artificielle.

Il est important de bien apprécier la taille et la consistance du follicule préovulatoire, ainsi que sa forme qui devient ovoïde pour **85%** des follicules avant l'ovulation. Dans ce cadre, un examen échographique se révèle intéressant.

3- Le transfert embryonnaire :

3-1 Définition :

Le transfert embryonnaire est une méthode artificielle de reproduction consistant à prélever (récolter, collecter) un embryon issu d'une fécondation « in vivo » (après saillie ou insémination artificielle) sur une femelle appelée donneuse et à transplanter (ou transférer) cet embryon dans l'utérus d'une femelle appelée receveuse (ou porteuse). **(BRUYAS J.F., LAGNEAUX D, 1992)⁵⁵.**

3-2 Historique :

Le transfert embryonnaire a été utilisé la première fois chez la lapine en 1890 par l'anglais W. HEAPE. Les premiers travaux chez les équins ont été publiés en 1972 par OGURI et TSUTSUMI mais c'est seulement huit ans plus tard que ces mêmes auteurs annoncent le premier succès de transfert d'embryon chez la jument **(OGURI N., TSUTSUMI Y, 1980)⁵⁶.**

La première méthode utilisée fut la technique chirurgicale. Parallèlement s'est développée une méthode non-chirurgicale, l'embryon était alors déposé dans l'utérus par voie cervicale.

En France, les premiers essais de transfert par voie cervicale ont débuté en 1982 du matériel de transfert conçu pour les bovins a d'abord été utilisé puis un matériel plus spécifique à l'espèce équine a progressivement été mis au point pour permettre en 1985 de réaliser le premier transfert embryonnaire commerciale à l'INRA de Tours sur la jument Blandice de Monsieur ROCHEFORT. Depuis, plus de **500** poulains sont nés en France grâce au transfert embryonnaire.

3-3 Avantages :

Le transfert embryonnaire présente, chez la jument, différents avantages et champs d'application spécifiques :

- Elle peut permettre d'augmenter, par transferts répétés, le nombre de produits nés par an d'une femelle élite.
- Un second aspect très attractif de ce procédé est la possibilité de gérer en parallèle la carrière sportive et la carrière reproductrice d'une jument.
- Le transfert embryonnaire peut également permettre d'obtenir des descendants chez des juments âgées et chez des juments présentant des lésions utérines, cervicales ou

vaginales rendant impossible une gestation à terme ou une mise bas mais ne perturbant ni l'ovulation ni la fécondation. De même, des juments jeunes de trois, voire deux ans, d'excellentes origines peuvent produire des poulains sans qu'une gestation ne vienne perturber la fin de leur croissance. Cela permet ainsi de réduire de près de dix ans l'intervalle entre générations.

- Enfin certaines utilisations plus ponctuelles peuvent encore valoriser cette méthode : on peut obtenir un ou des produits de juments qui font l'objet de transactions commerciales. Ainsi un éleveur, avant de vendre une jument, pourra lui faire produire des embryons et ainsi avoir des poulains de cette jument alors qu'elle ne lui appartient plus. De même, une jument « en retard » dans sa saison de reproduction et donc poulinant tardivement pourra avoir un poulain l'année suivante par transfert et recommencer cette même année une saison de reproduction de façon plus précoce.

On voit bien ici l'intérêt que peut susciter une telle technique mais bien que certains propriétaires tiennent à tout prix à obtenir une descendance de leur propre jument, cette technique s'adresse donc avant tout à des animaux de haute valeur génétique ou commerciale.

3-4 Inconvénients :

a) Technique :

Outre l'équipement nécessaire pour sa mise en œuvre, le transfert embryonnaire demande, comme nous l'avons vu, un suivi particulier des donneuses et des receveuses pour s'assurer d'un taux succès convenable. Devant l'absence de traitement de superovulation applicable, chaque embryon collecté devra faire également l'objet d'une attention toute particulière, ce qui demande là encore du temps et du personnel qualifié.

b) Synchronisation donneuse-receveuse :

D'autre part, les techniques de synchronisation des chaleurs ont peu évolué depuis **15** ans et donnent des résultats largement imparfaits. Comme nous l'avons vu, l'ovulation se produit en moyenne autour du **9** ème jour après la fin du traitement mais elle peut survenir en fait dès le lendemain et jusqu'au **18** ème jour après l'injection de prostaglandine.

Statistiquement, il faudrait **14** receveuses pour avoir **95%** de chance d'en avoir une dont le cycle serait synchrone à **24** heures près avec celui de la donneuse.

La gestion des receveuses représente pour l'instant la contrainte la plus lourde d'une opération de transplantation embryonnaire. Ceci permettrait de diminuer le coût et d'augmenter l'efficacité de transfert embryonnaire équin.

3-5 Technique de transfert embryonnaire :

3-5-1 choix des juments :

a) choix des juments donneuses :

Il est préférable de connaître le passé reproducteur des juments donneuses et de réaliser au préalable un examen gynécologique complet (examen transrectal et échographique, prélèvement utérin en vue d'effectuer un examen cytologique et bactériologique, biopsie utérine) afin de pouvoir établir un pronostic et évaluer les chances de succès. Les juments considérées comme subfertiles ou âgées ont en effet un taux de récolte faible et des embryons de moins bonne qualité.

b) choix des juments porteuses :

Le choix de la jument receveuse est important pour augmenter le taux de réussite du transfert d'embryon.

Race des porteuses utilisées en transfert d'embryon (monte 2015- SIRE) Ainsi il faudra choisir une jument dont la fertilité est connue possédant de bonnes qualités maternelles, ou une jeune maiden (jument qui n'a jamais été saillie), de préférence d'un gabarit supérieur à celui de la jument donneuse pour un meilleur développement du poulain. Les expérimentations récentes ont montré l'importance du milieu utérin pendant la gestation sur le développement du fœtus in utero, sur sa croissance et son métabolisme après la mise bas. Le fœtus est capable de s'adapter à l'environnement utérin mais, dans l'idéal, il faudrait pouvoir utiliser des receveuses de la même race que la donneuse pour que le métabolisme ne soit pas modifié.

Actuellement, les juments receveuses utilisées sont pour la plupart des juments Trotteur français (3/4) réformées des courses, viennent ensuite s'ajouter des juments de selle. Les juments de race de trait sont de moins en moins utilisées. En effet, les juments Trotteuses

réformées sont actuellement moins chères à l'achat. De plus, leur gabarit se rapproche d'avantage des juments de sang est plus appréciée (EAST L.M et al. 1998)⁵⁷.

3-5-2 Les traitements de synchronisation des juments donneuses et receveuses :

Comme nous l'avons déjà mentionné, la synchronisation des ovulations de la donneuse et de la receveuse reste également un impératif à la réussite du transfert d'embryon.

Par ailleurs, le transfert d'embryon ne peut se faire que chez une receveuse dont le cycle est synchrone avec celui de la donneuse. Aussi, la préparation de cette dernière doit comprendre un traitement de synchronisation. Deux types de protocoles sont actuellement utilisés (Figure 13). Le premier consiste en deux injections de prostaglandine ou d'un analogue de synthèse à **14-18** jours d'intervalle. Le second qui semble être le plus performant consiste en un traitement mixte de progestatifs (allyltrenbolone) à raison de **40** mg par jour per os pendant **7** à **10** jours suivi d'une injection de prostaglandine ou d'un analogue le dernier jour du traitement. L'ovulation a lieu autour du 9ème jour après la dernière injection avec une variabilité assez importante (Figure 13).

On peut améliorer la précision du moment de l'ovulation par injection de **2500** UI d'hCG (human Chorionic Gonadotropin) par voie intraveineuse. Ceci permet d'induire l'ovulation dans les **24** à **48** heures si l'injection est faite en présence d'un follicule souple de diamètre supérieur ou égal à **35** mm.

Dès le début de l'œstrus, un suivi échographique quotidien est impératif afin de suivre la croissance du ou des follicules, de déterminer le moment de l'insémination ou de la saillie et de diagnostiquer le plus précisément possible la date d'ovulation pour programmer le jour de la récolte de l'embryon.

Les meilleurs résultats sont obtenus après saillie naturelle ou insémination en sperme frais ou réfrigéré, la qualité de la semence étant réputée meilleure que celle du sperme congelé.

En pratique, cette différence tend actuellement à disparaître.

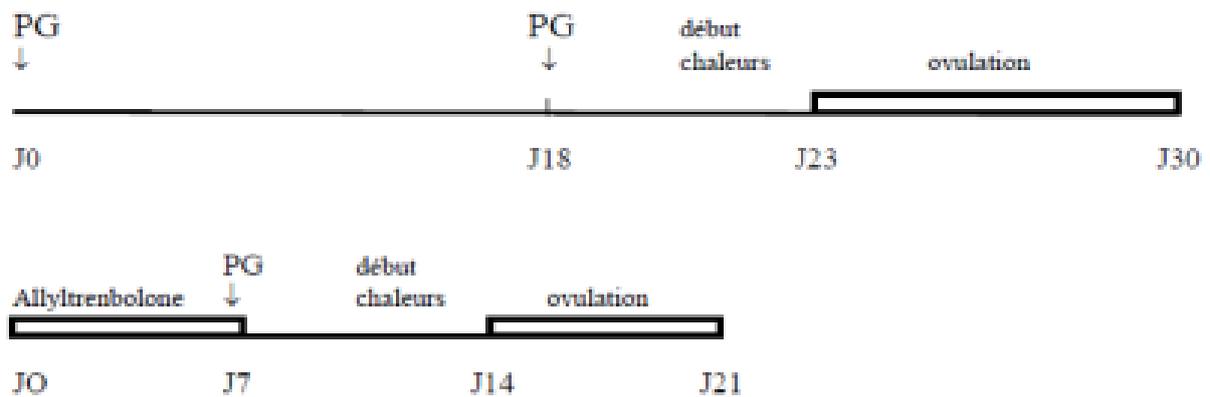


Figure 13 : Deux méthodes de synchronisation des chaleurs (BRUYAS et Al. 2013).

Les juments receveuses doivent être synchrones avec la donneuse, c'est-à-dire qu'elles doivent ovuler dans la même période que la donneuse. Ceci nécessite un suivi gynécologique très précis, une induction des ovulations et éventuellement un traitement de synchronisation des receveuses potentielles. En effet, les meilleurs taux de transfert sont obtenus lorsque la receveuse est à **J5, J6** ou **J7** par rapport à l'ovulation de la donneuse **J0**. Ainsi, la receveuse doit avoir ovulé le même jour que la donneuse ou **1** ou **2** jour(s) après. En dehors de cette plage de **3** jours, le taux de réussite est moindre (**LAGNEAUX D. et al. 1998**)⁵⁸.

Un suivi échographique quotidien permet de déterminer la date d'ovulation. Les mêmes protocoles de synchronisation des chaleurs que les juments donneuses sont utilisés, avec une préférence là encore pour le traitement à base de progestatif par voie orale associé à une injection d'une substance lutéolytique.

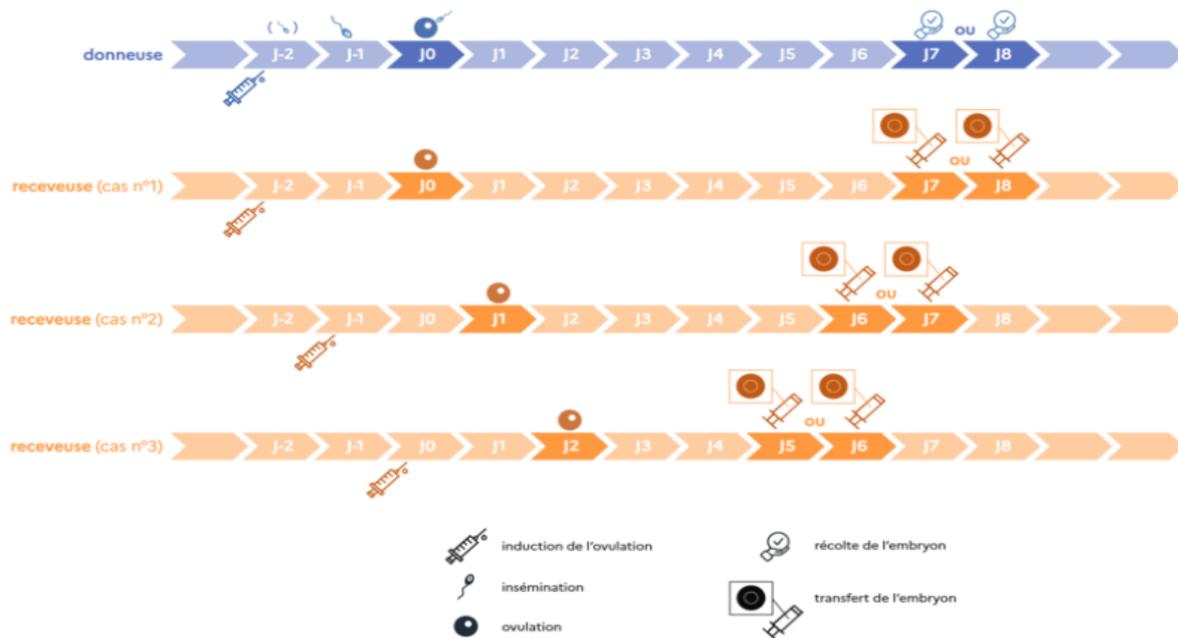


Figure 14 : Synchronisation de la donneuse et de la (des) receveuse(s) avant récolte et transfert d'embryon.

3-5-3 La récolte de l'éventuel embryon :

a) Choix du jour de la récolte :

Le choix du jour de la récolte repose sur la physiologie du développement embryonnaire pré-implantatoire : l'embryon doit être descendu dans les cornes ou le corps de l'utérus et il ne doit pas être à un stade de développement trop avancé au moment de la récolte.

Certaines expériences ont laissé supposer que l'embryon équin pouvait arriver dans l'utérus (après son transit intra tubaire) dès le cinquième jour après ovulation. Par contre, les taux de récolte sont assez faibles à cette date et des récoltes réalisées au septième, huitième et neuvième jour après l'ovulation donnent de meilleurs résultats qu'une récolte faite le sixième jour. Cependant, dans toutes ces études, le moment d'ovulation n'était déterminé par échographie que de manière quotidienne, ce qui laissait une certaine imprécision quant à l'âge réel de l'embryon le jour de la collecte.

Il semble en fait que la totalité des embryons parvienne dans l'utérus entre la **144ème** heure (**6** jours) et la **156ème** heure (**6,5** jours) après l'ovulation. En effet, avec un contrôle échographique plus précis de l'heure de d'ovulation, BATTUT et al. ont montré que le taux de collecte n'était pas différent entre des récoltes réalisées à la **156ème** heure (**6,5** jours) et

168ème heure (**7** jours) post ovulation, alors qu'il était nul si la récolte était effectuée à la **144ème** heure (**6** jours) (**BATTUT et al. 1998**)⁵⁹.

D'un point de vue pratique, il faudra donc laisser un temps suffisant à l'embryon pour qu'il parvienne dans l'utérus avant la récolte :

- soit en déterminant plus précisément la date d'ovulation par suivi bi ou quadri quotidien ce qui permet, en réalisant la récolte à **6,5** jours après constat de l'ovulation, d'obtenir des embryons âgés de **6,75+/-0,25** jours (suivi biquotidien) ou de **6,625+/-0,125** jours (suivi quadri-quotidien) ce qui peut être nécessaire dans certaines conditions (congélation d'embryons, endométrite).
- soit en récoltant plus tardivement à partir du **7ème** jour après constat de l'ovulation si le suivi échographique n'est que quotidien (âge de l'embryon = **7,5+/- 0,5** jours).

De plus, bien que la vésicule embryonnaire reste encore mobile dans l'utérus jusqu'au **16-17** Ème jour de gestation, il ne semble pas souhaitable de transférer un embryon âgé de plus de **8 à 9** jours. Il existe malheureusement très peu d'études comparatives des taux de gestation après transfert en fonction de la taille et de l'âge des embryons. Dès 1982, **SQUIRES et al.** avaient montré que le transfert d'embryons de **9** jours donnait significativement moins de gestations que celui d'embryons de **8** jours (**4%** contre **32%**). Plus précisément, le taux de gestation après transfert est significativement plus faible lorsque la taille de l'embryon est plus importante. Ceci peut s'expliquer par le fait qu'à partir du **6ème** jour l'embryon présente une augmentation très rapide de sa taille et qu'à partir du **7ème** jour se développe au sein de la masse cellulaire embryonnaire une cavité : le blastocœle. Or ces embryons plus âgés et leur blastocœle pourraient être plus fragiles et de manipulation plus délicate (**SQUIRES et al. 1985**)⁶⁰.

b) Technique de récolte :

Après une désinfection soignée des aires prégénitales et génitales externes, une sonde de récolte souple de diamètre interne de **8** mm, munie d'un ballonnet à son extrémité, est introduite par voie vaginale et cervicale dans la cavité utérine (Figures 15). Cette manipulation s'effectue le plus aseptiquement possible, l'opérateur étant muni de gants stériles et protégeant la sonde dans le creux de la main au cours de son trajet vaginal. Une

fois la sonde en place, le ballonnet destiné à assurer la fixité de son extrémité dans la portion distale du corps utérin et l'étanchéité du dispositif est gonflé à l'aide de **50 à 60 ml** d'air ou de milieu de collecte. Le liquide de collecte à **37°C** est introduit par gravité dans la cavité utérine; il est laissé en place pendant **3 à 5 minutes** avant d'être siphonné par gravité et grâce aux contractions utérines.

Il est déconseillé de réaliser une tranquillisation de la femelle pour effectuer cette opération, car les sédatifs entraînent fréquemment un relâchement (ou une moindre contractilité) du myomètre à l'origine à la fois de vidanges utérines incomplètes et de perte d'étanchéité du col utérin autour de la sonde de collecte. Un massage de l'utérus par voie transrectale de l'utérus peut être pratiqué pour améliorer la répartition dans l'utérus du liquide de collecte et favoriser son retour lors du siphonage. D'autres auteurs préfèrent éviter de pratiquer ce massage transrectal afin de diminuer le risque de contamination et stimulent les contractions utérines en maintenant une main dans le vagin pendant toute la durée de la collecte.

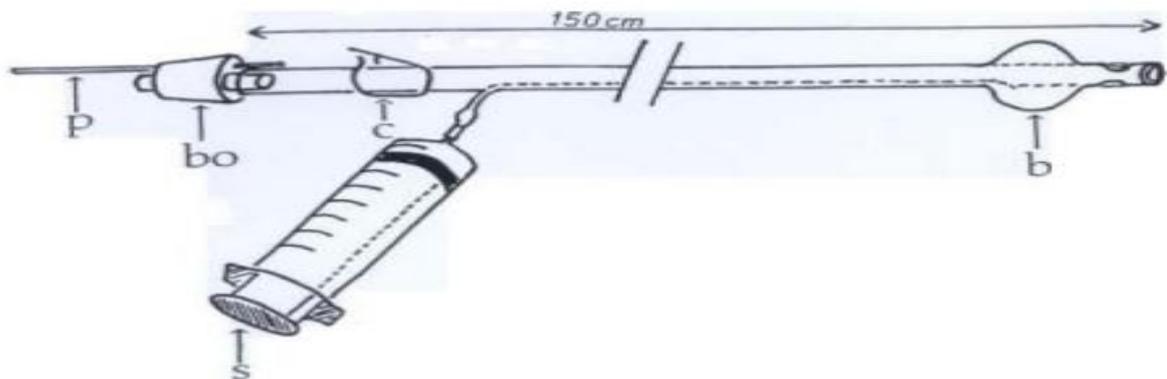


Figure 15 : schéma de la sonde de récolte d'embryons et du ballonnet de récolte (bo) au flacon muni de sa prise d'air (p). (c)dispositif pour clamber la sonde (b) ballonnet gonflé grâce a la seringue (s) d'après BRUYAS et LAGNEAUX.

Les liquides de collecte utilisés sont les mêmes que ceux employés pour la récolte des embryons de ruminants, à savoir du PBS (Phosphate Buffered Saline) modifié, enrichi de **2 à 4 g/l** d'albumine sérique ou de sérum sanguin à **1 ou 2 pour cent**. La quantité de liquide employé à chaque lavage est de l'ordre de **1 litre** et l'opération est renouvelée pour chaque récolte **2 ou 3 fois**.

Enfin, si aucun embryon n'a été collecté lors d'une première collecte, un nouveau lavage peut être pratiqué car si la moitié des embryons est collectée lors du **1er** rinçage, il est possible d'en récupérer au **4ème** voire au **5ème** rinçage utérin (Tableau 7) (**BRUYAS J.F., LAGNEAUX D. 1992**)⁵⁵.

Tableau 7 : distribution des embryons collectés en fonction de numéro de lavage-siphonage.

Nombre d'embryons récoltés au				
1 ^{er} lavage (p.cent)	2 ^{ème} lavage (p.cent)	3 ^{ème} lavage (p.cent)	4 ^{ème} lavage (p.cent)	5 ^{ème} lavage (p.cent)
20/58 (34)	20/58 (34)	13/58 (22)	4/58 (7)	1/58 (2)

Cela confirme qu'il est toujours possible de laisser un embryon dans l'utérus de la donneuse il faudra donc dans un premier temps déterminer le nombre de lavages-siphonages à effectuer en fonction de la valeur de la jument et dans un deuxième temps, après la dernière récolte, pratiquer une injection lutéolytique de prostaglandines pour éviter toute gestation éventuelle non désirée. Cette injection constitue en outre une excellente méthode de prévention des infections utérines pouvant faire suite aux collectes (**BRUYAS J.F., LAGNEAUX D. 1992**)⁵⁵.

c) Recherche de l'embryon :

Deux méthodes sont utilisées pour rechercher l'embryon dans le milieu de récolte :

- La première consiste à laisser décanter le liquide obtenu pendant **10** à **15** minutes à température ambiante (**20** à **25°C**). Ce temps de décantation permet à l'embryon plus dense de sédimenter au fond du flacon. Les **900** ml de liquide superficiel sont siphonnés pour ne garder que les derniers **100** ml.
- La deuxième solution consiste à filtrer immédiatement après récolte le liquide de collecte en utilisant un filtre d'une maille de **75** µm. Après filtration, il ne reste plus qu'une vingtaine de millilitres dans le filtre.

Le liquide de décantation ou restant après filtration ainsi que le liquide de rinçage du filtre (de même nature que le liquide de collecte) est versé dans une boîte de Pétri quadrillée et l'embryon est recherché au moyen d'une loupe binoculaire (grossissement **x 40 à 80**).



Figure 16 : Observation des embryons sous microscope.

Les embryons sont repérés sur le fond de la boîte sous la forme d'une petite bille plus ou moins translucide avec une périphérie réfringente. Cette réfringence est due aux enveloppes acellulaires externes que sont la zone pellucide et la capsule (spécifique de l'embryon équin).

A **6** jours post ovulation, les embryons récoltés sont à la fin du stade morula ou au début du stade blastocyste. Ils apparaissent relativement sombres, le blastocœle étant très peu développé, la zone pellucide est épaisse. Ils sont à peine plus gros qu'un ovocyte (**130 à 250** μm de diamètre) mais la différenciation morphologique est aisée puisque l'ovocyte est très ellipsoïde, aplati sur l'une des faces et comporte un matériel cytoplasmique floconneux, hétérogène et sombre. Lors d'ovulation multiple, on ne retrouve d'ailleurs que très rarement un ovocyte accompagnant l'embryon dans le milieu de collecte. Au **7ème** jour, le blastocyste mesure **400** μm de diamètre en moyenne, la zone pellucide et la capsule sont fines, le blastocœle occupe la quasi totalité de la cavité embryonnaire. Ce dernier est entouré d'une assise monocellulaire, le trophoblaste (ébauche des annexes foétales) ; le bouton embryonnaire (futur poulain) n'est qu'un amas de cellules indifférenciées refoulé par le blastocœle à un pôle de la vésicule. Au **8ème** et **9ème** jour, le blastocyste conserve la même morphologie générale mais son diamètre a augmenté (>**1mm** de diamètre). Le large blastocœle le rend très translucide et la zone pellucide n'est plus visible.

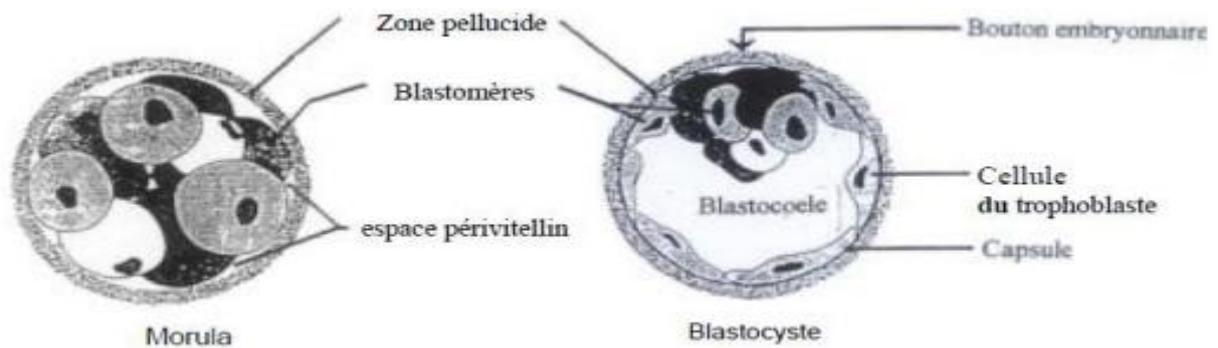


Figure 17 : structure histologique d'un embryon stade morula et blastocyste.

d) Evaluation de l'embryon :

Une fois identifié, une évaluation morphologique de l'embryon est établie selon une classification mise en place par McKINNON et SQUIRES. On attribue à chaque embryon une note de **1** à **5** en fonction de son aspect microscopique. Le stade **1** correspond à un embryon parfait alors que le stade **5** correspond à un embryon totalement dégénéré. Ceci permet d'éliminer les embryons de mauvaise qualité avec lesquels le taux de succès après transfert est fortement diminué (**17%** pour un embryon de stade **4**), et ainsi d'éviter de perdre un temps précieux dans la gestion de la donneuse en donnant une indication quant aux chances de succès du futur transfert. Ce système de notation est aussi utilisé pour évaluer une partie de la viabilité des embryons après congélation et décongélation.



Figure 18 : Ovocyte non fécondée et dégénéré.

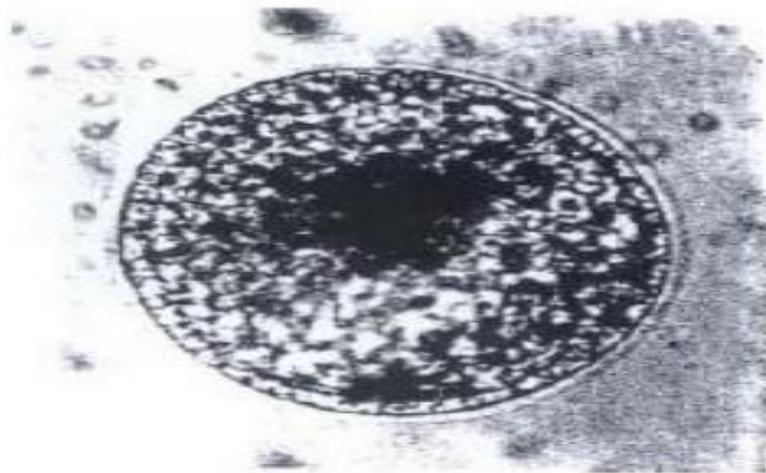


Figure 19 : Embryon au 7^{ème} jour, blastocyste.

e) Traitement de l'embryon :

L'embryon est ensuite lavé dans des bains successifs de milieu stérile identique dans sa composition au milieu de collecte. Il est transporté d'un bain à l'autre grâce à des micropipettes stériles ce qui assure son rinçage et par la même une dilution successive des éventuels germes contaminants. Il paraît alors judicieux de réaliser un bon nombre de bains, c'est-à-dire une dizaine comme cela est préconisé pour les embryons bovins. L'embryon est ensuite aspiré avec une petite quantité de milieu de collecte dans une paillette stérile.

L'idéal est de réaliser toutes ces manipulations sous hotte à flux laminaire qui assure un environnement quasi stérile au niveau de la platine de la loupe et la paillasse de manipulation. D'autre part, la viabilité de l'embryon étant fortement diminuée après deux ou trois heures à 20°C dans le milieu de récolte, il est impératif de réaliser toutes ces opérations le plus rapidement possibles.

3-5-4 Le transfert de l'embryon à la receveuse :

Le transfert de l'embryon dans la receveuse est l'étape la plus délicate et qui demande le plus d'expérience.

Deux méthodes sont actuellement utilisées en fonction des conditions de transfert :

- une méthode chirurgicale par le flanc.
- une méthode non chirurgicale empruntant la voie vaginale et cervicale.

a) Méthode chirurgicale :

Cette technique s'effectue sur jument debout, sous neuroleptoanalgésie. Une préparation chirurgicale du creux du flanc précède une anesthésie locale de la peau et des tissus plus profonds. Après incision cutanée, une dissection moussue des muscles abdominaux suivie d'une ponction du péritoine sont réalisées. La corne utérine est saisie et extériorisée dans sa partie proximale. Une incision ponctiforme de sa paroi permet le passage de la paillette montée au préalable sur une seringue de 1 ml. L'embryon est alors déposé dans la lumière utérine. La perforation utérine n'est refermée qu'avec une compression hémostatique de la paroi. Les plans musculaires, sous-cutanés et cutanés sont suturés. Des traitements anti-inflammatoire et antibiotique sont administrés pendant trois à cinq jours.

Cette méthode permet d'opérer dans des conditions strictement stériles et donc d'éviter toute contamination de la lumière utérine lors du dépôt de l'embryon. Elle semble donner de meilleurs résultats que la méthode non chirurgicale IULANO et al ont obtenu un taux de gestation de **72%** avec la méthode chirurgicale significativement différent des résultats obtenus avec la méthode cervicale **45%**. Plus récemment, un récapitulatif de trois ans de transfert embryonnaire commercial à l'université du Colorado permet de confirmer ces résultats (**58%** versus **39%** au 50ème jour de gestation). Elle nécessite cependant la mise en place d'une chirurgie techniquement plus lourde que la méthode cervicale (**IULANO et al. 1987**)⁶¹.

b) Méthode non chirurgicale ou cervicale :

On utilise un pistolet de transfert d'embryon stérile gainé (Type IMV1). Il permet de limiter les contaminations apportées par le matériel de transfert en passant par le vagin et le cervix seule la partie recouverte stérile accède théoriquement au corps de l'utérus. Son ouverture latérale protège la paillette et l'embryon tout au long de leur progression vaginale et cervicale.

Le rectum de la receveuse est tout d'abord vidangé, la queue recouverte d'un gant long stérile est attachée en hauteur. La zone périnéale et vaginale est savonnée plusieurs fois avec un antiseptique et rincée. L'opérateur utilise lui aussi des gants stériles. Malgré toutes ces précautions, cette technique donne encore des résultats inconstants : ils dépendent en

fait de l'habitude et de l'habileté du technicien. Des infections par des germes non pathogènes ont notamment été décrites, ainsi qu'un relargage excessif de prostaglandine lors de la manipulation du col pouvant entraîner l'expulsion de l'embryon. Cette technique est cependant facile à mettre en œuvre et est le plus souvent adoptée sur le terrain par des praticiens aguerris à la méthode de transplantation embryonnaire.

3-6 conservations des embryons :

a) La réfrigération :

La réfrigération de l'embryon peut être effectuée ce qui permet de le transporter. L'embryon doit être transféré dans la receveuse dans les **24** heures. Cette technique permet de gérer les receveuses sur un autre site que les donneuses. Les résultats de transfert d'embryon frais ne montrent pas de différence avec des embryons réfrigérés lorsque les conditions de manipulation et de conservation sont bien respectées.

b) La congélation :

L'embryon équin présente plusieurs caractéristiques qui en font un embryon difficile à cryoconserver (conserver par le froid) :

La capsule formée (membrane autour de l'embryon) à son arrivée dans l'utérus empêche les cryoprotecteurs de bien pénétrer dans l'embryon contrairement à des embryons d'autres espèces qui ne présentent pas de capsule.

La taille très hétérogène et pouvant aller jusqu'à **700**µm à **7** jours est un frein à la cryoconservation en raison des cristaux qui se forment dans la sphère liquidienne de l'embryon lors de la descente en température.

Pour s'affranchir de ces contraintes, l'embryon est vidé d'une grande partie de son liquide par micro-aspiration avant de le mettre au contact des cryoprotecteurs (alcool et lipides limitant la cristallisation par la glace). Ensuite il est congelé par vitrification (procédé de congélation ultra rapide par lequel l'embryon est plongé directement dans de l'azote liquide) à **-196**°C et conservé ainsi jusqu'au transfert.

Cette technique est encore en cours de développement dans les laboratoires de recherche afin de simplifier le processus et le rendre applicable à plus grande échelle sur le terrain. En

effet, à ce jour, la technique n'est réalisable que par des manipulateurs expérimentés en micromanipulation et le matériel reste coûteux.

3-7 Résultats techniques :

Taux d'embryon par récolte :

30 à 60%. Les chances de récolter un embryon à chaque collecte est fortement dépendant de l'âge de la donneuse et du type de semence utilisée. Les meilleurs taux sont observés avec des jeunes juments et la meilleure réussite avec de la semence fraîche par rapport à de la semence congelée.

Taux de gestation à J14 (diagnostic de gestation à 14 jours) par embryon transféré :

65 à 85%. Ce taux dépend de l'état physiologique et de la conformation de la receveuse (état du col de l'utérus). Il varie aussi avec le niveau d'expérience de l'opérateur.

Taux de gestation à J45 (diagnostic de gestation à 45 jours) par embryon transféré :

50 à 75 %. Ce taux reflète la capacité de l'utérus de la jument receveuse à réaliser les différentes étapes de la placentation et du développement du fœtus.

Bien que rarissime dans l'espèce équine, une gestation gémellaire à l'issue du transfert d'un embryon n'est pas à écarter. Il est donc conseillé d'envisager cette éventualité lors des premiers diagnostics de gestation, idéalement avant **J36**.

En raison de son coût, cette technique s'adresse à des reproducteurs de haute valeur génétique.

Partie expérimentale :

Objectifs :

L'objectif de notre étude est de faire une cryoconservation de la semence équine par l'utilisation de deux dilueurs différents (milieu Allemand et Equiplus). Le milieu allemand est supplémenté par un antioxydant (vit c) à raison de 5 mg/ml. Un essai de récolte et transfert d'embryon chez une jument.

Matériel et méthodes :

1- Lieux d'étude :

Cette étude a eu lieu au niveau de la wilaya de Tiaret, une partie a été effectuée au niveau de la « de la ferme expérimentale-université ibn khaldoun », la deuxième partie au niveau d'un haras privé (Haras El Mesk) de FEGHOULI, puis au niveau de Centre national de l'insémination artificielle et de l'amélioration génétique GNIAAG- TIARET. Pendant la période de 21 avril au 13 juin 2024.

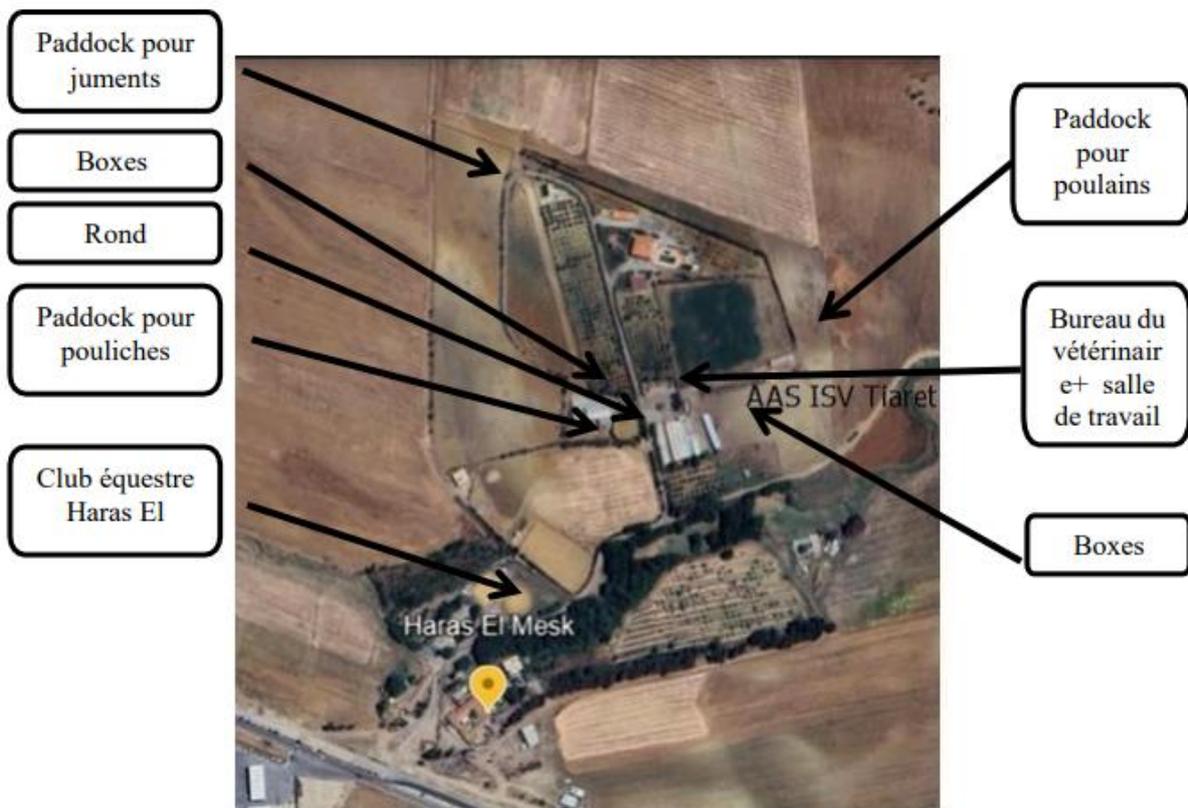


Photo 1 : Situation géographique et présentation du haras. (Photo personnelle)



Photo 02 : Le laboratoire du centre national d'insémination artificielle et de l'amélioration génétique de Tiaret. (Photo personnelle)



Photo 03 : la ferme expérimentale -université ibn khaldoun- Tiaret. (Photo personnelle)

2- Les animaux expérimentaux :

Deux juments (Dinara : jument arabe barbe âgée de 5 ans, Fayrouz : jument arabe barbe âgée de 4 ans) choisis parmi les juments de la ferme expérimentale ont été utilisées.

L'étalon ALFABETO DU CROATE, pur-sang arabe âgé de 14 ans Alezan brule (par QUEPHIR DU CROATE, AR / LEYLA DU CROATE, AR par BAROUR DE CARDONNE, AR) choisi parmi les étalons de HARAS EL MESK.



Photo 04 : l'étalon ALFABETO DU CROATE. (Photo personnelle)

Première partie : conservation de la semence équine

1- Déroulement de récolte :

1-1 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 et le biberon de récupération du 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.

1-2 La Préparation de la jument :

La jument est placée dans des conditions destinées à prévenir toute ruade et éviter ce faisant tout choc à l'étalon, conséquence qui peut avoir des répercussions psychologiques voire physiques et empêcher ou rendre plus difficiles des prélèvements de sperme ultérieurs. Le recours à des entravons est pour ce faire vivement recommandée.



Photo 05 : préparation de la jument. (Photo personnelle)

1-3 La préparation d'étalon :

Avant d'accéder à la récolte du sperme, l'étalon qui est maintenu dans son box 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 box vers la zone de récolte où il est stimulé dans un premier temps par la vue de la jument en oestrus, 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 présentant un oestrus comportemental. Qui est-elle même bien immobilisée par des entraves.



Photo 06 : Préparation de l'étalon. (Photo personnelle)

1-4 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.



Photo 07 : Récolte de l'étalon. (Photo personnelle)

2-Filtration de l'éjaculat :

Une fois récoltée, la semence était immédiatement filtrée dans un récipient gradué sur un papier filtre pour en retirer les impuretés et le « gel » qui contient le liquide séminal hautement toxique pour les SPZ en cryoconservation.

L'ensemble est préalablement chauffé à l'étuve jusqu'à 37 °C pour éviter tout éventuel choc thermique. Le volume de l'éjaculat filtré était ensuite évalué puis aliquoté dans **4** tubes de **50 ml** préalablement placés dans une étuve à **37°C**.

Mettre les tubes dans un bain marie à **37°C**.



Photo 08 : volume net de l'éjaculat avant filtration. (Photo personnelle)



Photo 9 : filtration de la semence. (Photo personnelle)

3-Évaluation initiale de la semence :

3-1 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 spermatozoïdes contenus dans l'éjaculat, dans notre prélèvement le volume avec gel était de **110ml** et après filtration nous avons eu **90ml**.

b) Couleur et aspect : la couleur et l'aspect de l'éjaculat était évalué à l'oeil nue afin de détecter la présence éventuelle de sang, d'urine ou de pus dans l'éjaculat. La couleur de notre éjaculat est d'une couleur blanc nacré.

3-2 Examen microscopique :

a) Motilité massale : On met une goutte de semence fraîche sur une lame propre, dégraissée, préchauffée à **37°C** et recouverte par une lamelle. Sous le microscope optique avec un grossissement **x10** et **x40** les mouvements de réunion et de dispersion des spermatozoïdes sont notés de **0** à **5** (Tableau 8) selon l'échelle de Milovanov. Selon notre observation la motilité massale est estimée à **4**.



Photo 10 : évaluation initiale de la semence par microscope optique. (Photo personnelle)

Tableau 8 : Échelle d'appréciation de la motilité massale du sperme. (D'après l'échelle de MILOVANOV, 1962).

Note	Interprétation
0	Pas de mouvement
1	Spermatozoïdes en mouvement mais pas de mouvement d'ensemble
2	Ébauche 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

b) Motilité individuelle :

Après la première dilution l'examen de la mobilité individuelle est l'observation d'une goutte de sperme placée entre lame et lamelle au fort grossissement **40** afin d'apprécier la mobilité progressive.

Le but de ce test est de déterminer le pourcentage de spermatozoïdes mobiles ainsi que la proportion de spermatozoïdes fléchant c'est-à-dire qui traversent le champ rapidement en ligne droite. Une semence de bonne qualité comporte **70%** de spermatozoïdes fléchants. L'analyse de la mobilité spermatique par microscopie optique demeure un examen subjectif,

même si l'erreur est réduite en confiant toujours la lecture au même opérateur expérimenté. Dans notre prélèvement la motilité individuelle est de **75%**.

4-Dilution de la semence :

Le diluant utilisé était EquiPlus® (100 ml, MINI-TUBE, Allemagne). Pour éviter des problèmes d'altération de ce milieu dans les flacons de 100 ml après ouverture, EquiPlus® était reconditionné par 20 ml, et rajouté à la semence pour une dilution de (1 :1 c'est à dire rajouter 1 volume de dilueur pour 1 volume de sperme).

Le second diluant utilisé était Allemand, on a fait trois dilution de (1/1 ; 1/2 ; 1/3)



Photo 11 : dilution de la semence. (Photo personnelle)

5- Décente de la température à 22°C :

Mettre les tubes contenant le sperme dilué dans un bain marie à 22 °C pendant 10 min.

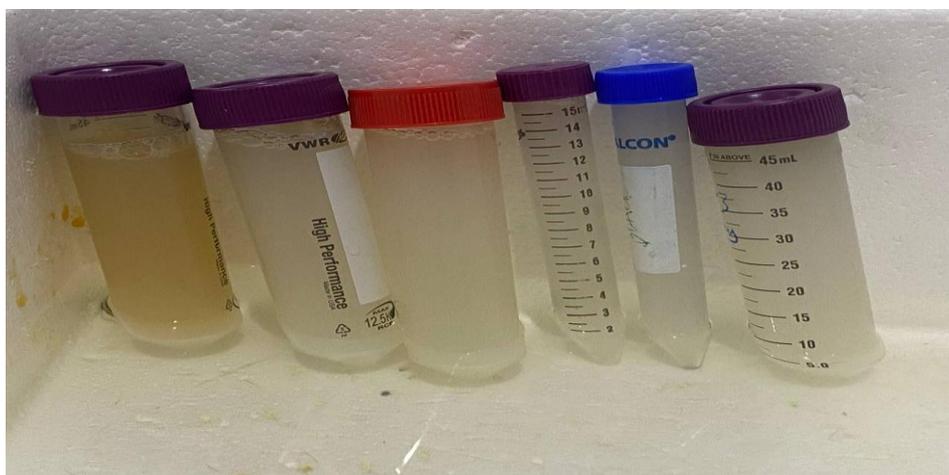


Photo 12 : les tubes de la semence dans un bain marie à 22°C. (Photo personnelle)

6- Centrifugation:

La semence est alors centrifugée à **600xg** pendant **10 min**, cette vitesse ne fait perdre qu'environ **15%** des spermatozoïdes (Heitland et al, 1996)⁶².



Photo 13 : centrifugation de la semence à 600xg pendant 10 mn. (Photo personnelle)

7- Elimination du surnagent et rajout du 2eme diluant :

Après centrifugation le surnagent est éliminé et le culot est récupéré.



Photo 14 : Elimination de surnagent. (Photo personnelle)

Tous d'abord, le milieu de dilution (Allemand) que nous avons préparé a été modifié en lui ajoutant **2.5%** de glycérol avec **20%** de plasma du jaune d'œuf et de la vitamine C (acide ascorbique) à raison de **5 mg/ml**. Le glycérol est pour l'amélioration de 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 (**Dascanio, 2014**)⁶³.

Le milieu EquiPlus® **98%** est additionné de **2 %** jaune d'œuf.

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 **7 mL**, ce volume obtenu était dilué par la suite en ajoutant **3 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 **15 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).

8-Remplissage des paillettes :

La semence diluée est conditionnée dans des paillettes mini tube contenant un volume de **0,5 ml**. Celles-là sont remplies par aspiration buccale à travers l'extrémité bouchonnée de la paillette.

Un petit volume de la semence est retiré de la paillette de manière a crée une bulle d'air.

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 éviter tous éclatement par le processus de dilatation.



Photo 15 : fermeture des paillettes par la poudre d'alcool polyvinyle. (Photo personnelle)

9- Décente de la température de 22°C à 4°C :

Les paillettes ont été mises dans un rack portoir de congélation, Ce rack a été placé dans une vitrine réfrigérée 4°C pendant 90 min.

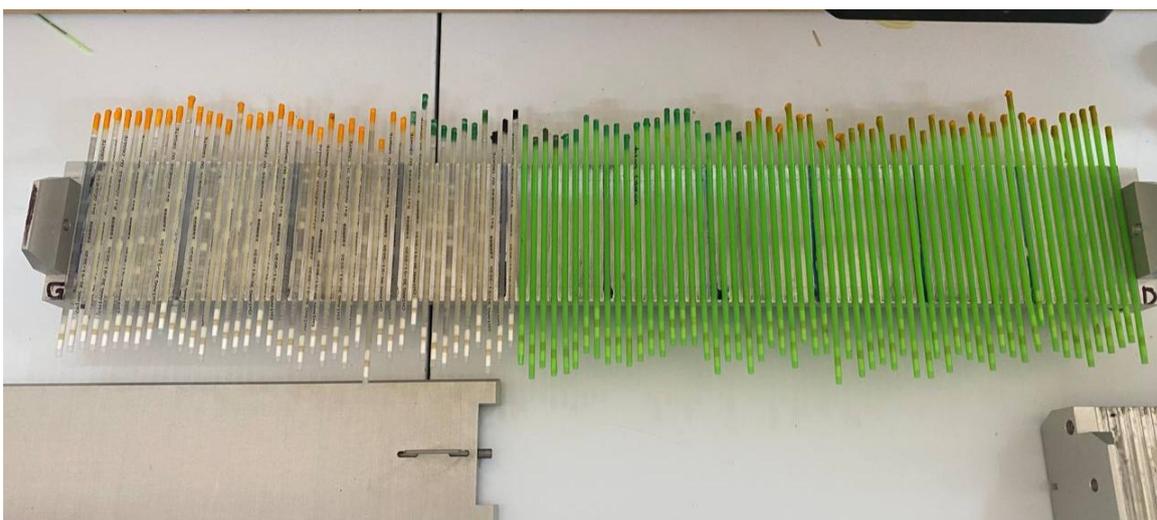


Photo 16 : Etalement des paillettes sur le rack portoir de congélation. (Photo personnelle)

10- Décente de la température de 4°C a -140°C :

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 et al., 1985)⁶⁴. Les paillettes ont ensuite été stockées dans des fuseaux tubes puis placées dans des canisters et maintenues immergées dans l'azote liquide jusqu'à décongélation.



Photo 17 : Etalement des paillettes sur le rack dans la vapeur d'azote. (Photo personnelle)

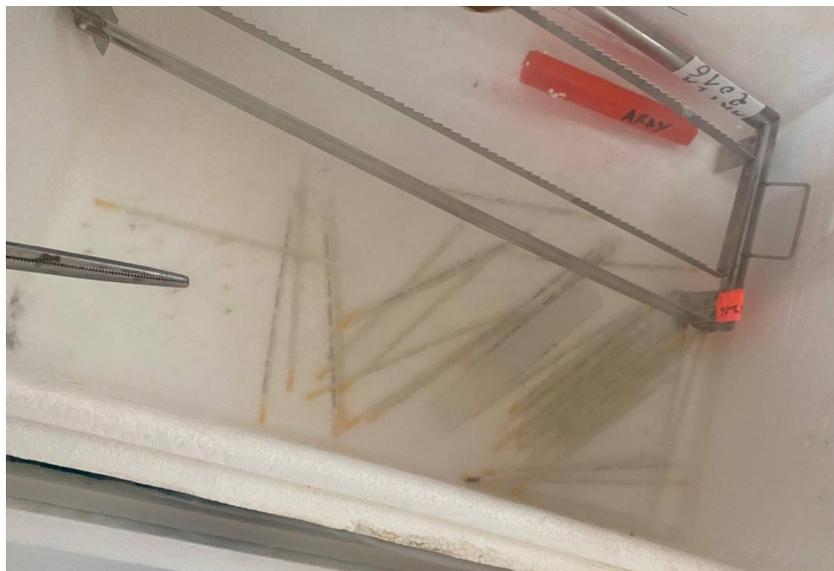


Photo 18 : paillettes plongées dans l'azote. (Photo personnelle)

11- Evaluation des paillettes après décongélation :

Pour décongeler, juste avant leur évaluation qui a été faite après **24** heures, trois paillettes de chaque dilueur 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.

La motilité des spermatozoïdes a été examinée et enregistrée à l'aide d'un microscope optique à platine chauffante et à contraste de phase juste à **0, 1/2** et une **1** heure 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 pour chaque dilueur.

Deuxième partie : Transfert embryonnaire.

Comme nous l'avons déjà mentionné, la synchronisation des ovulations de la donneuse et de la receveuse reste également un impératif à la réussite du transfert d'embryon.

1- Technique de transfert embryonnaire :

1-1 choix de la jument donneuse et receveuse :

Le choix de la jument donneuse est porté sur la jument Dinara, cependant le choix de la jument receveuse est porté sur la jument Fayrouz.

1-2 Suivi gynécologique et insémination de la jument donneuse :

La chaleur de la donneuse est suivie de très près à l'échographie pour savoir à quel moment il faut inséminer, et surtout à quel moment précis la jument ovule.

La jument a été inséminée artificiellement le 22 mai 2024 (follicule de 45mm) par une semence fraîche de l'étalon ALFABETO DU CROATE.



Photo 19 : Insémination artificielle de la jument Dinara. (Photo personnelle)

1-3 Les traitements de synchronisation :

La jument receveuse doit être synchronisée avec la donneuse, c'est-à-dire qu'elle doit ovuler dans la même période que la donneuse à un maximum de 3J de décalage par rapport aux bovins. Ceci nécessite un suivi gynécologique très précis, une induction des ovulations et éventuellement un traitement de synchronisation de la receveuse.

Tableau 9 : Suivis échographiques et traitements de synchronisations appliqués.

Date \ Jument	Dinara	Fayrouz
21/04/2024	OD : F 61/46mm OG : PF Ut : qlq plies	OD : PF OG : PF Ut : ut de transition
05/05/2024	OD : CJ OG : PF Ut : ut de dioestrus Application de PRID	OD : PF OG : PF Ut : ut de transition Application de PRID
12/05/2024	Retrait de PRID + inj IM de PGF2 α (75 μ g)	Retrait de PRID + inj IM de PGF2 α (75 μ g)
15/05/2024	OD : PF OG : PF Ut : qlq plies	OD : PF OG : PF Ut : ut de transition
21/05/2024	OD : PF OG : F 44/42mm Ut : ut de chaleur	OD : PF OG : 36/30mm Ut : ut de transition
22/05/2024	IA par semence fraîche de « ALFABETO DU CROATE »	
23/05/2024	OD : PF OG : 58/44mm Ut : ut de chaleur Inj IV de 2500UI hCG	OD : PF OG : 41/33mm Ut : qlq plies Inj IV de 2500UI hCG
26/05/2024	OD : PF OG : CJ Ut : ut de dioestrus	OD : PF OG : CJ Ut : ut de dioestrus

1-4 La récolte de l'éventuel embryon :

La récolte était faite le 02 juin 2024 (**J8 ; J0** : jour d'ovulation) par une sonde de collecte d'embryon (Mini tube Embryo Flushing Catheter CH36, 90cm avec ballonnet de 100ml) (Figures 39).

Après une désinfection soignée des aires périgénitales et génitales externes, une sonde de récolte souple de diamètre interne de 36 mm, munie d'un ballonnet à son extrémité, est introduite par voie vaginale et cervicale dans la cavité utérine. Cette manipulation s'effectue le plus aseptiquement possible, l'opérateur étant muni de gants stériles et protégeant la sonde dans le creux de la main au cours de son trajet vaginal. Une fois la sonde en place, le ballonnet destiné à assurer la fixité de son extrémité dans la portion distale du corps utérin et l'étanchéité du dispositif est gonflé à l'aide de **80 ml d'air**. **1.5** Litres de liquide de collecte (sérum Ringer Lactate) par lavage à **37°C** en faisant deux lavages sont introduits par gravité dans la cavité utérine; laissés en place pendant **3 à 5** minutes avant d'être siphonné par gravité et grâce aux contractions utérines.

Un massage de l'utérus par voie transrectale peut être pratiqué pour améliorer la répartition du liquide de collecte dans l'utérus et favoriser son retour lors du siphonage.



Photo 20 : sonde de collecte d'embryon (Mini-tube Embryo Flushing Catheter CH36, 90cm avec ballonnet de 100ml). (Photo personnelle)

La collecte de l'embryon consiste à filtrer immédiatement après récolte le liquide de collecte en utilisant un filtre d'une maille de **75 μ m**. Après filtration, il ne reste plus qu'une vingtaine de millilitres dans le filtre.



Photo 21 : collecte de l'éventuel embryon par un filtre d'une maille de 75 μ m. (Photo personnelle)

L'embryon est recherché au moyen d'une loupe binoculaire (grossissement x **40 à 80**).



Photo 22 : recherche de l'embryon au moyen d'une loupe binoculaire (gr x 40 à 80). (Photo personnelle)

La recherche a révélé qu'il n'y a pas un embryon (2 siphonages par jour ont été faits pendant deux jours consécutifs).

Résultats et discussions :

Première partie :

Evaluation de la qualité de la semence après récolte :

Dans notre travail nous avons trouvé que le pH =7, la mobilité massale a été de **4/5**, et le volume filtré (sans gel) a été de **90 ml**.

En ce qui concerne le nombre de sauts, nous avons enregistré trois sauts pour l'étalon.

Plusieurs variantes des milieux de dilution ont été utilisées à des fins de traitement de sperme congelé (**Jerez et al, 2016**)⁶⁵. 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**)⁶⁶. Les sucres sont des composants essentiels des dilueurs pour fournir l'énergie nécessaire à la glycolyse du sperme (**Aboagla et Terada, 2003**)⁶⁷.

Dans cette étude, nous avons utilisé deux milieux « milieu EquiPlus® + 2% Jaune d'œuf » et « milieu Allemand + 20% Jaune d'œuf + 2.5% glycérol + 5 mg/ml de la vitamine C » afin d'obtenir un meilleur résultat.

Evaluation de la qualité de la semence après la décongélation :

Les valeurs de la motilité qui ont été obtenues après la décongélation de la semence, sont représentées dans le tableau suivant :

Tableau 10 : présentation des valeurs de la motilité après décongélation (%).

	Valeurs de la motilité après décongélation (%)					
	0h		1/2 h		1 h	
	Allemand	EquiPlus®	Allemand	EquiPlus®	Allemand	EquiPlus®
Spermatozoïdes	50 %	40%	40%	25%	30%	10%

Les valeurs de la motilité après décongélation sont variées comme suit : de **0h** à **1h** avec le dilueur Allemand, le pourcentage des spermatozoïdes à diminuer petit à petit (**50%**, **40%**, **30%**).

Avec le dilueur EquiPlus®, le pourcentage des spermatozoïdes à diminuer lui aussi, mais de façon plus rapide par rapport au dilueur Allemand (**40%**, **25%**, **10%**).

Concernant les paramètres de mobilité des spermatozoïdes, les valeurs moyennes du pourcentage de spermatozoïdes rapides et de spermatozoïdes progressifs ont été plus élevées avec le dilueur préparé Allemand qu'avec le dilueur EquiPlus® commercialisé.

Les valeurs de la vitalité qui ont été obtenues après la décongélation de la semence, sont représentées dans le tableau suivant :

Tableau 11 : présentation des valeurs de la vitalité après décongélation (%).

	Valeurs de la vitalité après décongélation (%)					
	0h		1/2 h		1h	
	Allemand	EquiPlus®	Allemand	EquiPlus®	Allemand	EquiPlus®
Spermatozoïdes	80%	80%	70%	70%	60%	60%

Pour la vitalité, les valeurs après décongélation sont variées comme suit : de **0h** à **1h** (**80%**, **70%**, **60%**) pour les deux dilueurs : allemand et EquiPlus®.

On remarque que les valeurs de la motilité et viabilité ne sont pas liées (une diminution marquée dans la motilité (**40%** ,**25%**, **10%**). Versus une diminution très légère dans la viabilité (**80%**, **70%**, **60%**). Ceci peut être justifié par la notion : un spermatozoïde viable il n'est pas obligatoirement mobile.

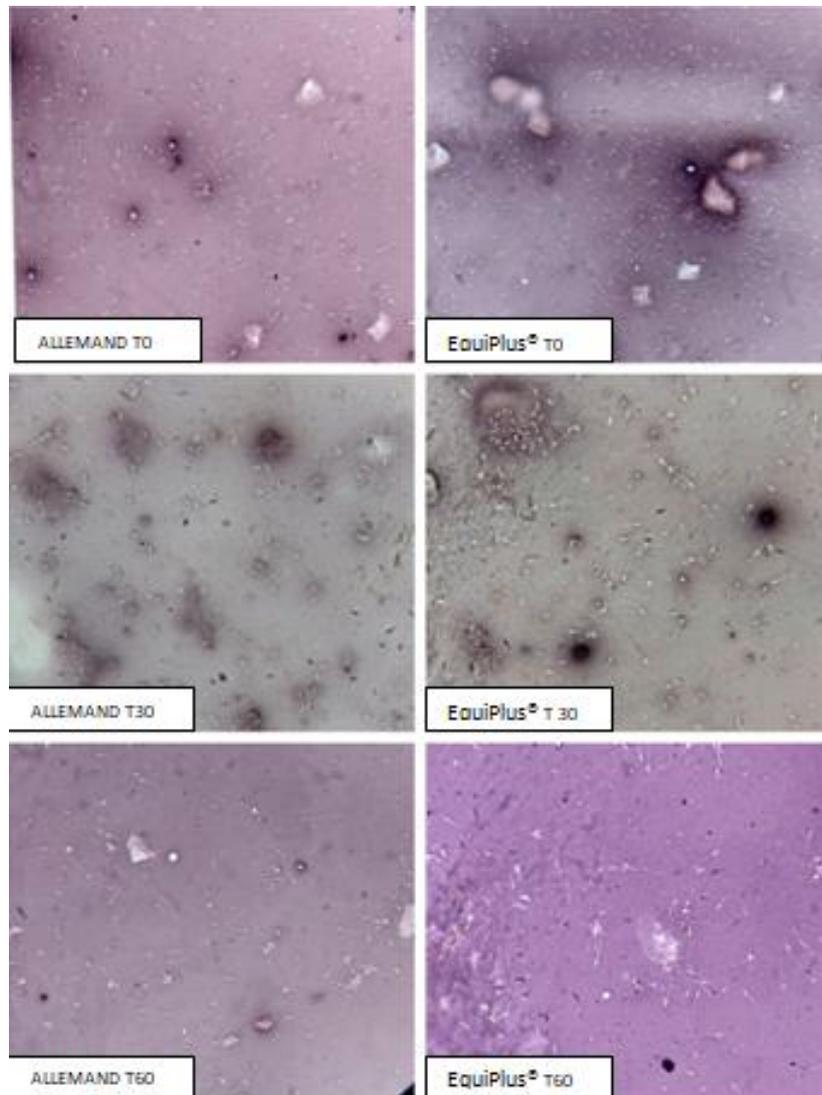


Photo 23 : Observation microscopique de la semence après décongélation (gr x40). (Photo personnelle)

Dans notre étude nous avons trouvé que les valeurs de la motilité avec le dilueur Allemand sont (**50%**, **40%**, **30%**) Versus (**30%**, **19%**, **12%**) des valeurs de la motilité avec dilueur Allemand utilisé dans une autre étude (**Hadidi, 2022**)⁶⁸. On remarque que les valeurs obtenues dans notre étude sont supérieures à celui des valeurs obtenues dans la deuxième étude.

Pour la vitalité nous avons trouvé que les valeurs avec le dilueur Allemand sont (**80%, 70%, 60%**) Versus (**76%, 71%, 65%**) des valeurs de la viabilité avec dilueur Allemand utilisé dans une étude (**Hadidi, 2022**)⁶⁸. On remarque que les valeurs obtenues dans notre étude sont similaires à celui des valeurs obtenues dans la deuxième étude.

Deuxième partie :

Suivi gynécologique et détermination de jour d'ovulation :

Dans notre étude un suivi gynécologique a été fait pour bien déterminer le jour de l'ovulation et à la suite déterminer le jour de récolte.

La jument Dinara a été examinée par une échographie le 23 mai 2024, l'examen a révélé la présence d'un follicule de **58/44** mm dans l'ovaire gauche avec des petits follicules dans l'ovaire droit et un utérus de chaleur. Une injection de **2500UI** d'hCG a été faite. Elle a été réexaminée le 26 mai 2024, l'examen a révélé la présence d'un corps jaune au niveau de l'ovaire gauche avec des petits follicules dans l'ovaire droit et un utérus de dioestrus. Ce qui montre que l'ovulation s'est produite pendant cet intervalle de **3jrs**.

Choix de jour de récolte :

Il semble en fait que la totalité des embryons parviennent dans l'utérus entre la **144ème** heure (**6 jours**) et la **156ème** heure (**6,5 jours**) après l'ovulation. En effet, avec un contrôle échographique plus précis de l'heure de l'ovulation, BATTUT et al. ont montré que le taux de collecte n'était pas différent entre des récoltes réalisées à la **156ème** heure (**6,5 jours**) et **168ème** heure (**7 jours**) post ovulation, alors qu'il était nul si la récolte était effectuée à la **144ème** heure (**6 jours**) (**BATTUT et al. 1998**)⁵⁹.

Dans notre étude nous avons fait la récolte de l'éventuel embryon à **J8 (J0 : jour d'ovulation)** Cette récolte a révélé l'absence de l'embryon.

L'absence de l'embryon peut être liée au non conception de la jument. Et c'est justifié par le taux faible de la récolte d'un embryon (**30%**).

Conclusion :

Dans la fin de notre étude les résultats obtenus sont très insuffisants par rapport à ceux que nous voulions obtenir au départ.

Dans la présente étude nous avons conclu que l'utilisation du milieu de dilution Allemand a donner de bon résultats dans la cryoconservation de la semence équine et cela par les différents paramètres de fertilités de la semence évaluer dans notre travail à savoir la motilité et la vitalité anté et post congélation, l'utilisation des antioxydants et des cryoprotecteurs améliorent le taux de viabilité de la semence en post congélation.

Le transfert embryonnaire est l'une des techniques nouvelles qui représente un grand intérêt scientifique et économique.

Il est temps pour l'Algérie de s'ouvrir sur les biotechnologies de reproduction et plus spécialement le transfert embryonnaire, mais pour cela il est primordial de :

Potentialiser les élevages en termes de méthodes d'élevages.

Trouvez des solutions pour maîtriser l'alimentation qui est l'une des causes majeures d'infertilité et d'infécondité en Algérie.

Modernisation de la reproduction et des techniques de la reproduction assistées (insémination artificielle, congélation de la semence...).

Instaurer une banque génétique des lignées algériennes.

Autoriser cette pratique sous des conditions juridiques.

Références bibliographique :

- 1-Daels P.F. (2003). New technics of artificial insemination in the mare. In: Belgian Equine Practitioners Society (Ed.), Proceedings de la 20e journée d'étude de la Belgian Equine Practitioners Society, Bruxelles.
- 2-Vidament M. Dupere A.M. JULIENNE P.EVAIN A. NOUE P. PALMER E. (1997) : Equine Frozen semen : Freezability and fertility field results. *Theriogenology*, 1997, 48, 907-917.
- 3-Vidament M. French field results (1985–2005) on factors affecting fertility of frozen stallion semen. *Anim. Reprod. Sci.* 2005;89:115–136.
- 4- Sauvier charlotte (2016) : LE TRANSFERT EMBRYONNAIRE CHEZ LA JUMENT : DE LA FORMATION EN ECOLE VETERINAIRE A LA PRATIQUE SURLE TERRAIN.
- 5-Nicolich .C, (1989). L'insémination artificielle équine. Thèse méd. Vét. Nantes n° 22, ENV Nantes, Nantes, 205 p.
- 6-Chevalier F. C., (1980). Contribution à l'étude de l'insémination artificielle du cheval. Thèse Méd. vét. n°12, ENV Alfort, Créteil, 91 p.
- 7-Valon F., Chaffaux S., (1983) : Le prélèvement du sperme chez le cheval. *Rec. Med. Vet.*, 159 (11): 699-973.
- 8- Fauquenot A., (1987). L'insémination artificielle chez les équidés. *BTIA*, 44 (mai): 23-26.
- 9-Corde R., (1985) : Saillie - Insémination artificielle - Infertilité du mâle. In : MaisonsAlfort, France, Assoc. Pour l'Etude de la Repro. Animale. La reproduction chez le cheval. Physiologie - pathologie : 67-73.
- 10- Varner D.D. (2008) : Developments in stallion semen evaluation. *Theriogenology*. ;70:448–462.
- 11- Hoogewijs M., Rijsselaere T., De Vlieghe S., Vanhaesebrouck E., De Schauwer C., Mirjan Thys J.G., Hoflack G., Soom A.V., de Kruif, A. (2010) : Influence of different centrifugation protocols on equinesemen preservation. *Theriogenology* 74 118–126.

- 12- Parrilla-Hernandez S., Deleuze S., Van Den Berghe F., Ponthier J. Raw (2012) : semen concentration directly influences CASA velocity pathways. *J. Equine Vet. Sci.* ;32:505.
- 13- Hoogewijs M., De Vliegher S., De Schauwer C., Govaere J., Smits K., Hoflack G., de Kruif A., Van Soom A. (2011) : Validation and usefulness of the Sperm Quality Analyzer V equine for equine semen analysis. *Theriogenology.* ;75:189–194.
- 14- Brinsko S.P., Blanchard T.L., Varner D.D., Schumacher J., Love C.C., Hinrichs K., Hartman D. (2011) *Manual of Equine Reproduction*. 3rd ed. Mosby Elsevier; Maryland Heights, MO.
- 15- Johansson C.S., Matsson F.C., Lehn-Jensen H., Nielsen J.M., Petersen M.M. (2008) : Equine spermatozoa viability comparing the NucleoCounter SP-100 and the eosin-nigrosin stain. *Anim. Reprod. Sci.* ;107:325–326.
- 16- Janett F., Thun R., Niederer K., Burger D., Hassig M. (2003) : Seasonal changes in semen quality and freezability in the Warmblood stallion. *Theriogenology.* ;60:453–461.
- 17- Pickett B.W. (1993) Factors affecting sperm production and output. In: McKinnon A.O., Voss J.L., editors. *Equine Reproduction*. Lea & Febiger; Philadelphia, PA, USA: . pp. 689–704.
- 18- Rao Veeramachanemi D.N. (2011) : Spermatozoal Morphology. In: Mc Kinnon A.O., Squires E.L., Vaala W.E., Varner D.D., editors. *Equine Reproduction*. 2nd ed. Wiley-Blackwell; Chichester, UK: . pp. 1297–1307.
- 19- Amann R.P., Graham J.K. (2011) Spermatozoal Function. In: Mc Kinnon A.O., Squires E.L., Vaala W.E., Varner D.D., editors. *Equine Reproduction*. 2nd ed. Blackwell Publishing; Oxford, UK: pp. 1053–1084.
- 20- Weber J.A., Woods G.L. (1992) : Transrectal ultrasonography for the evaluation of stallion accessory sex glands. *Vet. Clin. N. Am. Equine Pract.* ;8:183–190.
- 21- Dowsett K. F, Pattie W. A, (1987). Variation in characteristics of stallion semen caused by breed, age, season of year and service frequency. *J. Reprod. Fert.*, 35:645-657.
- 22- Pozor M.A., Zambrano G.L., Runcan E., Macpherson M.L. (2012) : Proceedings of AAEP. American Association of Equine Practitioners; Lexington, KY, USA: . Usefulness of Dip Quick Stain in Evaluating Sperm Morphology in Stallions; pp. 506–510.

- 23- 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.
- 24- Aziz N., Saleh R.A., Sharma R.K., Lewis-Jones I., Esfandiari N., Thomas A.J., Jr., Agarwal A. (2004) : Novel association between sperm reactive oxygen species production, sperm morphological defects, and the sperm deformity index. *Fertil. Steril.* ;81:349–354.
- 25- Berkovitz A., Eltes F., Lederman H., Peer S., Ellenbogen A., Feldberg B., Bartoov B. (2006) : How to improve IVF-ICSI outcome by sperm selection. *Reprod. Biomed. Online.* ; 12:634–638.
- 26- Said T.M., Aziz N., Sharma R.K., Lewis-Jones I., Thomas A.J., Jr., Agarwal A. (2005) : Novel association between sperm deformity index and oxidative stress-induced DNA damage in infertile male patients. *Asian J. Androl.* ; 7:121–126.
- 27- Baumber-Skaife J. (2011) : Evaluation of Semen. In: Mc Kinnon A.O., Squires E.L., Vaala W.E., Varner D., editors. *Equine Reproduction*. Wiley-Blackwell; Ames, IO, USA: pp. 1278
- 28- Varela E., Rey J., Plaza E., Munoz de Propios P., Ortiz-Rodriguez J.M., Alvarez M., Anel-Lopez L., Anel L., De Paz P., Gil M.C., (2018) : How does the microbial load affect the quality of equine cool-stored semen? *Theriogenology.* ;114:212–220.
- 29- Al-Kass Z., Spergser J., Aurich C., Kuhl J., Schmidt K., Morrell J.M. (2019) : Effect of presence or absence of antibiotics and use of modified single layer centrifugation on bacteria in pony stallion semen. *Reprod. Domest. Anim.* ;54:342–349.
- 30- PALMER E., DRIANCOURT M.A., ORTAVANT R. (1984) : Photoperiodic stimulating of the mare during winter anestrous. *J. Reprod. Fert., suppl.* 32, 275-282 85.
- 31- 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.
- 32- Barbas J. P. et Mascarenhas R. D. (2008) : Cryopreservation of domestic animal sperm cells. *Cell Tissue Bank.* Vol. 10, n° 1, p 49 62.
- 33- Barrier Battut .I ; Cuir.F ; Ferry.B; Magistrini.M ; Margat A et Provost E (2014) : *Insémination artificielle équine*.5ème édition – Avril 2014.p 61, 63.

- 34- 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.
- 35- 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.
- 36- 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.
- 37- Bo G. Crabo, (2001) : Physiological Aspects of Stallion Semen Cryopreservation. *Brinsko Sp, Crockett Ec, Squires El.* (2000) Effect of centrifugation and partial removal of seminal plasma on equine spermatozoal motility after cooling and storage. *Theriogenology*. 54 (1) 129-36.
- 38- Contri A, Amicis ID, Molinari A, Faustini M, Gramenzi A, Robbe D, Carluccio A. (2011) : Effect of dietary antioxidant supplementation on fresh semen quality in stallion. *Theriogenology* ;75:1319–26.
- 39- Ball BA, Vo AT, Baumber J. (2001) : Generation of reactive oxygen species by equine spermatozoa. *Am J Vet Res* ;62:508–15.
- 40- Aurich JE, Schönherr U, Hoppe H, Aurich C. (1997) : Effects of antioxidants on motility and membrane integrity of chilled-stored stallion semen. *Theriogenology* ;48:185–92.
- 41- Agüero A, Miragaya MH, Mora NG, Chaves MG, Neild DM, Beconi MT. (1995) : Effect of vitamin E addition on equine sperm preservation. *Comunicaciones Biologicas* 13:343–56.
- 42- Baumber J, Ball BA, Linfor JJ. (2005) : Assessment of the cryopreservation of equine spermatozoa in the presence of enzyme scavengers and antioxidants. *Am J Vet Res* 66:772–9.
- 43- Thiele JJ, Friesleben HJ, Fuchs J, Ochsendorf FR. (1995) : Ascorbic acid and urate in human seminal plasma: determination and interrelationships with chemiluminescence in washed semen. *Hum Reprod* ;10:110–5.

- 44- Agarwal A, Saleh RA, Bedaiwy MA. (2003) : Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertil Steril* ;79:829–43.
- 45- Silva PFN. (2006) : Physiology of peroxidation process in mammalian sperm. PhD thesis. Utrecht University, Ridderprint. Ridderkerk.
- 46- Dad S, Bisby RH, Clark IP, Parker AW. (2006) : Formation of singlet oxygen from solutions of vitamin E. *Free Radic Res* ;40:333–8.
- 47- Agarwall A, Virk G, Ong C, du Plessis SS. (2014) : Effect of oxidative stress on male reproduction. *World J Mens Health* ;32:1–17.
- 48- Moreira da Silva F, Marques A, Chaveiro A. (2010) : Reactive oxygen species: a double-edged sword in reproduction. *The Open Veterinary Science Journal* ;4:126–32.
- 49- Agarwal A, Nallella KP, Allamaneni SS, Said TM. (2004) : Role of antioxidants in treatment of male infertility: an overview of the literature. *Reprod Biomed Online*;8:616–27.
- 50- Knight JA, Blaylock RC, Searles DA. (1993) : The effects of vitamins C and E on lipid peroxidation in stored erythrocytes. *Ann Clin Lab Sci* ;23:51–6.
- 51- Agarwal, RK Sharma, (1996) : Role of reactive oxygen species in male infertility 835-850.
- 52- Baronne R. (1978) : Chapitre I : Appareil génital femelle. In: Anatomie compare des mammifères domestiques. Tome 4. Splanchnographie II. Vigot , 83-250.
- 53- GINTHER O.J. (1997) : Reproductive biology of the mare : basic and applied aspects. 2nd ed., Grossplains (Wisconsin) : Equiservices, 642 p. 42.
- 54- Blanchard TL, (2003) : Manual of equine reproduction. 2nd edition. Mosby (2003). Thèse de de Doctorat de l'Université « CLAUDE-BERNARD » de LYON I (Médecine -Pharmacie), FRANCE.
- 55- BRUYAS J.F., LAGNEAUX D. (1992) : Transplantation embryonnaire Equine. *Rec. Méd. Vét.*, 168, 973- 991 13.
- 56- OGURY N., TSUTSUMI Y. (1980) : Non surgical transfert in equine embryos. *Arch. embryology*, 5, 108- 110 81.

- 57- EAST L.M., VAN SAUN R.J., VANDERWALL D.K. (1998) : Equine embryo transfer. Donor and recipient selection and preparation. *Equine Practice*, 20, 16-20 25.
- 58- LAGNEAUX D. (1998) : Transfert d'embryons-aspects techniques. In : *Compte rendu de la 25ème journée d'étude du CEREOPA*, Paris, 3 Mars 1999. Paris : Institut du cheval, 61-67 67.
- 59- BATTUT I., COLCHEN S., FIENI F., TAINTURIER D., BRUYAS J.F. (1998) : Success rates when attempting to nonsurgically collect equine embryos at 144, 156 or 168 hours after ovulation. *Equine vet. J.*, suppl. 25, 60-62 8.
- 60- SQUIRES E.L., GARCIA R.H., GINTHER O.J. (1985) : Factors affecting success of equine embryo transfer. *Equine Vet. J.*, suppl. 3, 92-95 92 105.
- 61- IULIANO M.F., SQUIRES E.L., COOK V.M. (1987) : Effect of age of equine embryos and method of transfer on pregnancy rate. *J. Anim. Sci.*, 1985, 60, 258-263 63. JOHNSON A.L. : Gonadotropin-releasing hormone treatment induces follicular growth and ovulation in seasonally anóstrus mares. *Biol. Reprod.*, 36, 1199-1206 64.
- 62- Heitland AV, Jasko DJ, Squires EL, Graham JK, Pickett BW, Hamilton C. (1996) : Factors affecting motion characteristics of frozen-thawed stallion spermatozoa. *Equine Vet J* ;28:47–53.
- 63- Dascanio J and Patrick JM, (2014) : *Equine Reproductive Procedures*, First Edition. Edited by John Wiley & Sons, Inc. Published 2014 by John Wiley & Sons, Inc. 560p (p333).
- 64- Cristanelli MJ, Amann RP, Squires EL, Pickett BW. (1985) : Effects of egg yolk and glycerol level in lactose–EDTA–egg yolk extender and of freezing rate on the motility of frozen–thawed stallion spermatozoa. *Theriogenology* ;23:25–38.
- 65- 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.
- 66- 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.

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

68- Hadidi I, (2022) : Effets des différentes concentrations et combinaisons de cryoprotecteurs sur la qualité et l'intégrité fonctionnelle du sperme équin. Thèse de Master complémentaire de l'Université « Ibn khaldoun » de Tiaret, Algérie.

